UNIVERSITÉ DE PROVENCE
(AIX-MARSEILLE I)

FACULTÉ DES SCIENCES (ST-CHARLES)

Doctorat d'Université

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE LA FRACTION TERPENIQUE NON VOLATILE EXTRAITE DES GALBULES DE CYPRES CUPRESSUS SEMPERVIRENS VAR. HORIZONTALIS.

présentée par

Armand ROUSSEY

LE 30 JUIN 1973

Membres du Jury :

Président : M. le Professeur CHOUTEAU

Membres : M. le Professeur BERNARD
M. le Professeur DELAAGE

Travail réalisé dans le Laboratoire de Biochimie Macromoléculaire du Professeur DELAAGE et dans le Laboratoire de Matière Médicale du Professeur P. BERNARD (U.E.R. Pharmacie)

UNIVERSITÉ DE PROVENCE

(AIX-MARSEILLE I)

FACULTÉ DES SCIENCES (ST CHARLES)

Doctorat d'Université

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE LA FRACTION TERPENIQUE NON VOLATILE EXTRAITE DES GALBULES DE CYPRES CUPRESSUS SEMPERVIRENS VAR

Digitized by the Internet Archive
in 2026

présentée par

Armand ROUSSEY

LE 10 JUIN 1972

Membres du Jury :

Président : M. le Professeur CHOUTEAU

Membres : M. le Professeur BERNARD

M. le Professeur DELAAGE

https://archive.org/details/IA41549012_0020

UNIVERSITÉ DE PROVENCE
(AIX-MARSEILLE I)

FACULTÉ DES SCIENCES (ST-CHARLES)

Doctorat d'Université

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE LA FRACTION TERPENIQUE NON VOLATILE EXTRAITE DES GALBULES DE CYPRES CUPRESSUS SEMPERVIRENS VAR. HORIZONTALIS.

présentée par

Armand ROUSSEY

LE 30 JUIN 1973

Membres du Jury :

Président : M. le Professeur CHOUTEAU

Membres : M. le Professeur BERNARD
M. le Professeur DELAAGE

Travail réalisé dans le Laboratoire de Biochimie Macromoléculaire du Professeur DELAAGE et dans le Laboratoire de Matière Médicale du Professeur P. BERNARD (U.E.R. Pharmacie)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes Amis,

A Monsieur le Professeur CHOUTEAU,

Vous m'avez fait l'honneur de présider mon Jury de thèse ; je vous remercie bien vivement d'avoir accepté de juger ce travail et je vous exprime toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur BERNARD,

Qu'il me soit permis de vous exprimer ma profonde gratitude pour la bienveillance dont vous avez fait preuve à mon égard. Vous avez bien voulu me permettre de poursuivre mes travaux dans votre Laboratoire de Matière Médicale et me guider de vos conseils. Je suis très touché que vous ayez accepté de faire partie de mon Jury.

A Monsieur le Professeur DELAAGE,

Malgré le peu de temps que te laisse un emploi du temps chargé, tu as bien voulu diriger cette thèse. Je te remercie d'avoir su aplanir les difficultés de toutes sortes qui n'ont cessé de survenir et des efforts que tu as dû consentir pour que ce travail aboutisse. J'ai été très sensible au tact avec lequel tu m'as prodigué ton soutien amical.

- Avant-Propos -

Une certaine pudeur m'a toujours poussé à différer les témoignages de gratitude que je désirais adresser à ceux, dont l'enseignement, les conseils et l'aide matérielle, ont permis la réalisation de ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur CORRIOL, professeur de Physiologie à la Faculté de Médecine de Marseille et Monsieur le Docteur JOANNY, chargé de Recherches au C.N.R.S., de m'avoir initié aux subtilités de la Recherche médicale.

Je remercie Monsieur le Professeur DESNUELLE, professeur de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences de Marseille, d'avoir accepté que j'effectue une partie de ce travail au Centre de Biochimie Macromoléculaire.

Je remercie Monsieur le Professeur BOUYARD, professeur de Pharmacologie Médicale à la Faculté de Médecine, de la confiance dont il a bien voulu m'honorer en me permettant de participer aux activités de son Laboratoire.

Je remercie Monsieur le Professeur TRAYNARD, professeur de Chimie Industrielle à la Faculté des Sciences, d'avoir bien voulu m'autoriser à utiliser les installations de son Laboratoire de Microanalyse.

Je remercie Monsieur le Professeur METZGER, professeur de Chimie à la Faculté des Sciences et Monsieur le professeur SURZUR, Professeur de Chimie Organique à la Faculté des Sciences, de leurs précieux conseils et de l'équipement de laboratoire qu'ils ont bien voulu mettre à ma disposition.

Je remercie Monsieur le Professeur VINCENT, Professeur de Chimie à la Faculté des Sciences et Monsieur Gérard SALMONA, Ingénieur Chimiste, de m'avoir permis d'utiliser les possibilités de leur spectrographe de masse et d'avoir bien voulu me faire profiter de leur expérience.

.../...

Je remercie Messieurs NUNZIATI René, Maître-Assistant à l'Université de Provence, SOULIE Alain, Assistant à l'Université de Provence, ARBELOT Michel, Assistant à l'Université de Provence, pour leur aide amicale et l'ambiance agréable qu'ils ont su créer dans leur Laboratoire.

Je remercie Mesdemoiselles Giselle DAVIDOVICS Jeanne BERGER et Danielle BOUIN de leur gracieux concours.

Enfin, en cette occasion, qu'il me soit permis de blesser dans leur modestie mes amis les plus chers. Il y a longtemps que je voulais leur exprimer mon estime. Ils m'ont appris l' Equipe . Leur chaleur et leur enthousiasme m'ont révélé qu'on peut aller, parfois, au-delà de ce qui parait possible. Leur sens de l'humour, dans les pires moments, m'a aidé à aborder plus facilement le cortège des tracasseries quodidiennes.

Roland COTTET, Maître-Assistant à l'Université de Provence, avec son désintéressement coutumier et sa gentillesse, m'a permis de réaliser une partie importante de ce travail, dans une ambiance sympathique et dans la bonne humeur.

C'est avec beaucoup de délicatesse que le Docteur Pierre BALANSARD, Assistant-Chef de Clinique des Hôpitaux et Monsieur Guy BALANSARD, Maître-Assistant à la Faculté de Pharmacie de Marseille, ont accepté que j'use sans vergogne de leur secours. Toujours prêts à m'accueillir et à m'aider, ils ont toujours su m'accorder un moment malgré leur emploi du temps lourdement chargé. Je leur en suis infiniment reconnaissant.

Je veux remercier Françoise FAURE, Assistante des Hôpitaux, de la gaieté, du tact et de la compétence dont elle fait preuve en toute circonstance.

Grâce aux connaissances, à la bonne volonté et à la gentillesse de tous ces chercheurs, ce travail de thèse entretiendra, pour moi, le souvenir d'une étape enrichissante sur le plan professionnel et sur le plan humain.

Université de Provence

U.E.R. Scientifiques

Président : F. BOREL

Secrétaire général : C. MOYNAULT

PROFESSEURS

MM.	J. VALENSI	Mécanique expérimentale des fluides
	P. ROUARD	Physique générale
	P. DESNUELLE	Chimie biologique
	M. MERIGOUX	Physique industrielle
	C. FEHRENBACH	Astronomie
	A. FAVRE	Mécanique de l'atmosphère et météorologie
	A. GUILLEMONAT	Chimie industrielle
	G. CARPENI	Chimie
	Y. DOUCET	Physique
	JM. SOURIAU	Méthodes mathématiques de la physique
	J. METZGER	Chimie
	L. FOURES	Mathématiques
	D. MALE	Physique
	G. BODIOU	Mathématiques appliquées
	M. NAUDET	Chimie des corps gras
	P. BOUSQUET	Physique
	P. PESTEIL	Physique
	P. CASAL	Mécanique rationnelle et appliquée
	G. GOUVERNET	Géologie appliquée
	A. VISCONTI	Physique théorique
	A. BLANCHARD	Mathématiques générales
	M. DUSSARDIER	Physiologie animale
	P. QUEZEL	Botanique
	E. CRAUSSE	Physique (Avignon)
	A. JULG	Chimie Théorique
	S. TAXY (Mme)	Géologie historique
	F. TESSIER	Géologie générale
	ML.FURNESTIN(Mme)	Biologie animale
	M. BERTRAND	Chimie
	J. TROMPETTE	Physique
	M. LAFFITTE	Chimie

MM.	R. FRAISSE	Mathématiques
	C. BLANCHARD (Mme)	Mathématiques
	R. NEGRE	Biologie végétale
	R. COULON	Physique
	R. KERN	Minéralogie
	L. SIDERIADES	Physique
	JM. SURZUR	Chimie organique
	H. CHANTREL	Physique de l'espace
	J. SOUGY	Géologie
	J. HERVE	Electronique
	H. BODOT	Chimie
	J. CHOUTEAU	Physiologie animale
	R. PHILIP	Physique
	L. CAPELLA	Minéralogie
	P. BILLARD	Mathématiques
	M. BONNEAU	Mathématiques
	JC. TRAYNARD	Chimie industrielle
	C. CLARION (Melle)	Mécanique des fluides
	A. PONS	Botanique
	A. GIRARDIE	Zoologie
	J. MANDELBROJT	Physique
	M. BIZOUARD	Physique
	JP. DAVID	Physique
	JC. MAIRE	Chimie
	M. SIMON	Physiologie animale
	G. MARCHIS-MOUREN	Chimie biologique
	R. PETIT	Physique
	M. HUGON	Psycho-physiologie

PROFESSEURS SANS CHAIRE

R. AMAR	Zoologie
L. DEVEZE	Biologie marine
F. BOREL	Techniques mathématiques de la physique
R. CHANDEBOIS (Melle)	Biologie animale
H. GUENOCHE	Mathématiques appliquées
F. PECAUT (Mme)	Mathématiques (Avignon)
J. HENNEQUIN	Electronique
S. GUEIRARD (Melle)	Pétrographie
C. FEUGEAS	Chimie
J. CABANE	Chimie
G. RASIGNI	Physique
S. COMBET	Chimie
R. GARRON	Physique expérimentale

M. CADILHAC	Physique
B. WAEGELL	Chimie
F. HALBWACHS	Physique (Avignon)
M. PICHENOT (Melle)	Biologie végétale
M. GILLET	Physique
JP.ROGGERO	Chimie (Avignon)
L. SARDA	Biochimie
C. ROMAN	Physiologie animale
A. GILLET	Mathématiques
S. MARTINUZZI	Physique

MAITRES DE CONFERENCES

H. PATIN	Chimie
J. CRESP	Biologie animale
M. BENARROCHE	Physique
H. TACHOIRE	Chimie
E. VINCENT	Chimie
L. VICENTE	Biologie animale
J. MANUCEAU	Mathématiques
R. GUERMEUR	Physique
M. DELAAGE	Biochimie
F. CATZIGRAS (Melle)	Géologie
M. SIRUGUE (Mme)	Physique
H. MERDY	Physique
L. PUJOL	Chimie
A. LAVAGNE	Biologie végétale
J. GIUDICELLI	Biologie animale
M. FOUGEREAU	Biochimie
G. NOAT	Physiologie végétale
R. BOUDET	Mathématiques
R. STREIFF	Chimie
JP.BELAICH	Microbiologie
P. NEVILLE	Biologie végétale
JP.SOUBLIN	Mathématiques
S. DELACHE (Mme)	Mathématiques
C. VIVES	Physique (Avignon)
A. CASALOT	Chimie
G. FARDOUX	Chargé d'enseignement-Mathématiques
B. MORIN	Chargé d'enseignement-Mathématiques
B. BALLET	Chargé d'enseignement-Mathématiques (Avignon)

S O M M A I R E

INTRODUCTION

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A - Botanique

B - Résultats généraux sur l'étude chimique des composants du cyprés

a) Composants de la fraction volatile

b) Composants de la fraction non volatile

PARTIE II : ETUDE CHIMIQUE EXPERIMENTALE DES COMPOSANTS DE LA FRACTION NON VOLATILE DES EXTRAITS DE GALBULES DU CUPRESSUS SEMPERVIRENS VAR. HORIZONTALIS

A - Préliminaires

B - Recherche et identification éventuelle du torulosol

C - Recherche, étude chimique, proposition d'identification des composants de la fraction non volatile à caractère acide

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

--0--

- INTRODUCTION -

La biochimie de la cellule procaryothe est maintenant convenablement avancée, plus de la moitié de ses composants ont été identifiés ; un rôle précis a pu être attribué à chacun d'eux.

La cellule eucaryothe, beaucoup plus complexe, fait maintenant l'objet de recherches intenses facilitées par le fait qu'on y rencontre peu de substances réellement différentes de celles qui ont été identifiées dans la cellule procaryothe.

Par contre, la cellule végétale pose des problèmes originaux dont l'étude est à peine amorcée. Elle contient, en quantité importante, des substances qu'on ne trouve nulle part ailleurs, dont l'identification est loin d'être achevée.

Comme ce fut le cas pour les bactéries et les levures, il est bien évident qu'il est indispensable de bien connaître le plus grand nombre possible de composants, avant d'espérer comprendre le métabolisme si particulier de la cellule végétale.

La présente thèse s'inscrit dans cet ordre de préoccupation. Nous avons choisi d'étudier quelques composants de la fraction non volatile des extraits de galbules de cyprés (cupressus sempervirens var. horizontalis). Ce végétal, connu depuis l'Antiquité pour ses propriétés toni-veineuses, n'a fait l'objet jusqu'ici que d'études fragmentaires orientées surtout vers les huiles essentielles ; tandis que, dans d'autres espèces de la famille des cupressacées, des corps terpéniques non volatils ont pu être identifiés.

Il nous est apparu intéressant de tourner notre choix vers l'étude de la fraction terpénique non volatile obtenue à partir des galbules du cupressus sempervirens var. horizontalis, dans le but d'établir si les terpènes de cette variété de cyprés sont identiques à ceux identifiés dans les autres espèces ou bien s'ils présentent une structure originale.

Nous nous sommes rapidement rendu compte que ce choix allait nous amener à mettre au point des méthodes d'extraction, de purification et de contrôle très particulières.

De plus, les résultats obtenus à partir de ces méthodes dépendant étroitement des conditions de culture, de récolte, de stockage, il nous a semblé indispensable de les faire précéder par une étude botanique.

- PARTIE I -

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Plan :

A - BOTANIQUE

1.- Nomenclature
2.- Description du C. Sempervirens
3.- Répartition géographique
4.- Culture et récolte
5.- Parties employées

B - RESULTATS GENERAUX SUR L'ETUDE CHIMIQUE DES COMPOSANTS DU CYPRES

a) Composants de la fraction volatile

1.- Extraction
2.- Généralités analytiques
3.- Extraits essentiels
4.- Travaux divers
5.- Pharmacologie
6.- Industrie

b) Composants de la fraction non volatile

1.- Fraction tannique
2.- Fraction terpénique

--0--

A - BOTANIQUE

1.- Nomenclature

Cupressus sempervirens (cyprés toujours vert)

Nom vernaculaire : cyprés

Variantes :

- Cyprés d'Italie : cupressus sempervirens
  - pyramidilis
    - fastigiata
    - conica
  - horizontalis
    - arizonica
- Cyprés Portugais : cupressus sempervirens
  - lusitanica
  - glanca
  - pendula
  - sinensis
- Cyprés Lambert : cupressus sempervirens
  - macrocarpa
  - lambertiana
  - guadelupensis
  - monterey
- Cyprés du Japon : cupressus sempervirens
  - obtusa
- Cyprés de l'Himalaya : cupressus sempervirens
  - torulosa
- Cyprés Lawson : cupressus sempervirens
  - lawsonniana

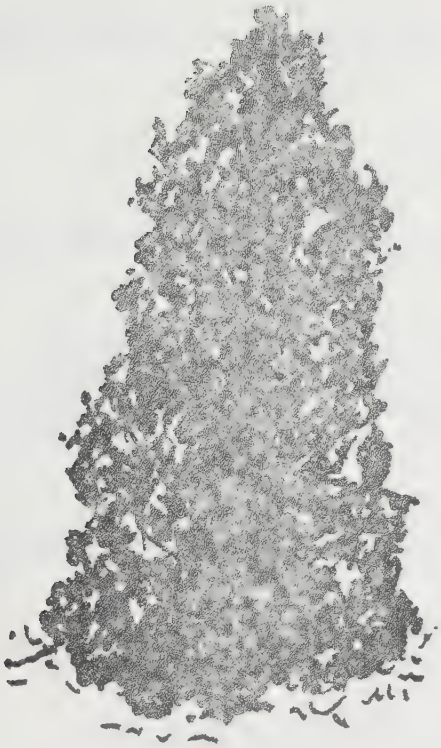


fig..3

Cupressus Sempervirens
var. Lawsonniana

fig. 1

Cupressus Sempervirens
var. Pyramidilis

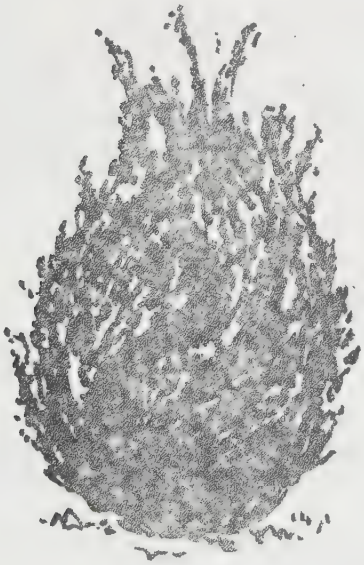


fig. 4

Cupressus Sempervirens
var. Macrocarpa

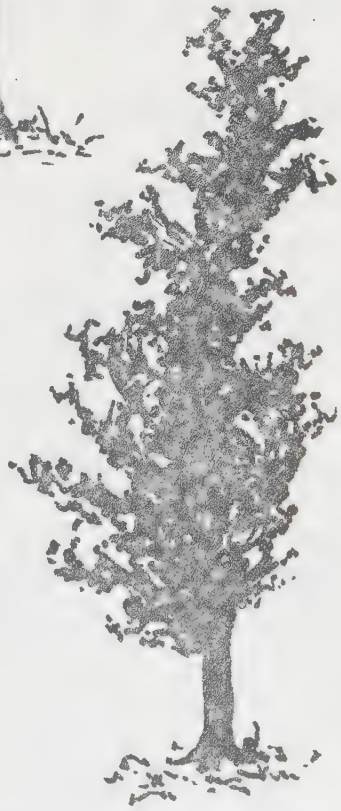


fig. 2

Cupressus Sempervirens
var. Horizontalis

2.- Description du Cupressus Sempervirens -

Cupressacées

Arbre de l'ordre des coniférales

Haut, parfois de plus de 25 mètres, il a un tronc élancé dont l'écorce est rougeâtre et fissurée.

Ses branches sont nombreuses et ramifiées. Elles sont disposées en longue cime étroite et pyramidale (C. Semp. var. pyramidilis fig.1, Planche I) ou en colonne torsadée plus ou moins régulière (C. Semp. var. horizontalis, fig. 2, Planche I ou lawsonniana, fig. 3, Planche I).

Les feuilles persistantes, fig. 6, Planche II, qui couvrent entièrement les rameaux, fig. 5, Planche II, sont vert foncé.

Elles ont l'aspect d'écailles triangulaires, imbriquées sur quatre rangs.

Les inflorescences mâles et femelles sont terminales et deviennent visibles en avril-mai.

Les cônes staminés ♂, fig. 5a, Planche II, très petits et ovoïdes ont des anthères déhiscentes longitudinalement.

Les cônes pistillés ♀ , fig. 7, Planche II, globuleux, de 2 à 3 cm de diamètre, comportent 6 à 12 écailles brunâtres, d'aspect satiné, non soudées, opposées en croix qui se lignifient pendant la maturation (automne de l'année après la floraison).

Ces écailles sont munies chacune de nombreux ovules.

Les cônes pistillés ♀ sont improprement appelés "galbules" ou "noix" de cyprés.

Cependant, l'emploi du terme "galbule" pour désigner le fruit du cyprés, étant très répandu, nous l'utiliserons dans la suite du texte.

Toutes les parties de l'arbre exhalent une odeur d'essence de térébenthine.

Les canaux sécréteurs de résines sont localisés dans l'écorce, dans les tubes criblés ou liber de la tige, et le liber de la racine.

- PLANCHE II -

fig. 7
cône pistillé femelle
récolté vert

fig. 9
cône pistillé femelle mature

fig. 5a
cône pistillé mâle

fig. 6
feuille

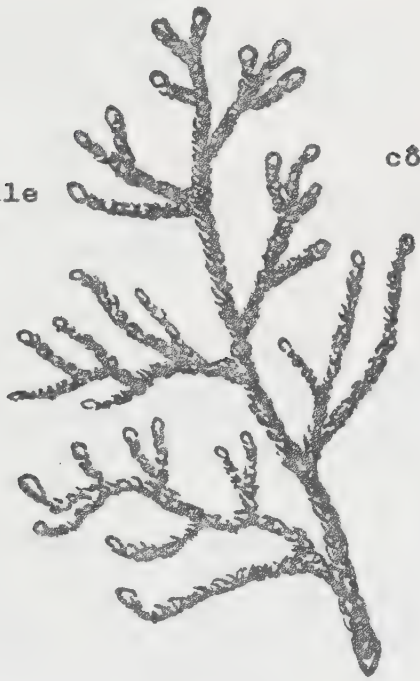


fig. 5
jeune rameau

fig. 10
graine

fig. 8
jeune cône pistillé femelle

3.- Répartition géographique -

Originaire d'Orient (Indes, Asie occidentale), le cyprés est surtout planté en Italie et dans le midi de la France (Cyprés d'Italie, cyprés Lambert).

On le rencontre en bordure des cimetières et dans les parcs où il sert de plante ornementale, en lisière des champs cultivés où il constitue des haies serrées contre la violence du vent (11).

Cependant, on trouve aussi des cultures de cyprés en Afrique du Nord (Cyprés d'Italie), en Allemagne (Cyprés Lawson), en Espagne et au Portugal (Cyprés Portugais) (9).

Quelques cultures expérimentales ont été réalisées au Kenya (Cyprés Portugais), au Guatemala, en Californie (variétés non identifiées) (9).

Dans l'île de la Guadeloupe (zone de la baie de Monterey), on a identifié une variété de cyprés (Cupressus macrocarpa var. guadelupensis) qui s'est, par la suite, très bien acclimatée sur la Riviéra française et italienne (9).

D'autres plantations sont exploitées dans l'Himalaya (Cup. Semp. var. torulosa) et au Japon. C'est du cyprés japonais d'ailleurs (Cup. Semp. obtusa) qu'on tire l'huile "Hinoki", utilisée par l'industrie japonaise à la place de l'essence de lavande (9).

4.- Culture et Récolte -

Culture.-

Le cyprés ne s'acclimate pas toujours, même lorsque certains paramètres microclimatiques, topographiques et de nature du sol semblent réunis.

Généralement, on sème en sol léger et chaud, perméable, sec et calcaire pour les espèces telles que le cyprés d'Italie, dans le Midi et le Sud-Ouest de la France, par exemple (11).

Le cyprés arizonica, qui a besoin du même type de sol, s'acclimate plus facilement. On le repique dans toute l'Europe méridionale, en Amérique du Nord.

En Bretagne, dans le Pays Basque, en Languedoc Roussillon, les sols profonds, même calcaires ou bien le sable des dunes conviennent parfaitement au Cyprés Lambert.

Les sols médiocres, froids et le climat marin des côtes du Nord de la France dont s'accommode le cyprés Lawson, ont permis de nombreuses plantations de cette espèce dans ces régions.

Les cyprés sont, en principe, émondés tous les quatre ou cinq ans pour éviter les méfaits du vent (11).

Récolte.-

Les galbules doivent être récoltés verts et charnus de début Mai à fin Septembre. La lignification dûe à la maturation leur faisant perdre leurs principes actifs (21).

5.- Parties employées -

Fruits (Codex 1866, galbules) (21), (4), (1), (11), (7).

Feuilles (Pharma. mexic., 1904) (17), (11), (7).

Pousses et jeunes rameaux (17), (5), (9).

Bois (18), (26).

B - RESULTATS GENERAUX SUR L'ETUDE CHIMIQUE DES COMPOSANTS DU CYPRES -

a) Composants de la fraction volatile -

Une étude bibliographique quelque peu exhaustive, nous a permis de nous rendre compte que les études physico-chimiques des substances naturelles extraites du cyprés portent surtout sur les essences.

1.- Extraction -

La qualité et le rendement des essences sont variables. Ils sont fonction de :

- partie de l'arbre utilisée,
- variété botanique,
- lieu de culture,
- époque de la récolte,
- mode d'extraction.

Nous avons pris deux exemples empruntés à la littérature :

- les essences extraites du cyprés d'Italie sont, en général, les plus appréciées. Elles semblent convenir aux fins industrielles auxquelles elles sont destinées (9).

  Pour la production de ces extraits, on utilise les cimes fraîches, les rameaux et jeunes feuilles, en évitant les parties ligneuses.

- la durée de la distillation et la tension de vapeur ont une grande influence sur l'extraction (23).

2.- Généralités analytiques -

Nous avons dressé une liste générale afin de pouvoir exploiter les références et paramètres physico-chimiques que nous avons relevés dans les différentes et nombreuses publications qui ont retenu notre attention.

- Densité à 20°C ou 25°C :
- Extrait sec : (E. S.)
- Point de fusion : (P_f.)
- Polarimétrie : Pouvoir rotatoire à 20°C ou 25°C $(\alpha)_D$
- Indice d'acide : I_A
- Indice de saponification : I_s
- Critères de solubilité dans les solvants usuels
- Chromatographie (papier, couche mince) (C. C. M.)
- Procédés analytiques du Codex
- Spectrographie infra-rouge (I. R.)
- " de masse (S. M.)
- " dans l'ultra-violet et le visible (U. V.)
- Résonance magnétique nucléaire (R. M. N.)

3.- <u>Extraits essentiels</u> -

Les essences extraites des différentes variétés de cyprés présentent les généralités suivantes :

Couleur :

- variable
  - de jaune paille (cyprés Portugais) à ambre foncé (cyprés des Indes)

Odeur :

- variable
  - odeur d'essence de térébenthine (cyprés Italien)
  - odeur d'huile de pin (cyprés Portugais)
  - odeur d'essence de lavande (cyprés Japonais : huile Hinoki)

Solubilité :

dans l'éthanol à 95°

- très variable de 2 à 10 volumes

Composition chimique :

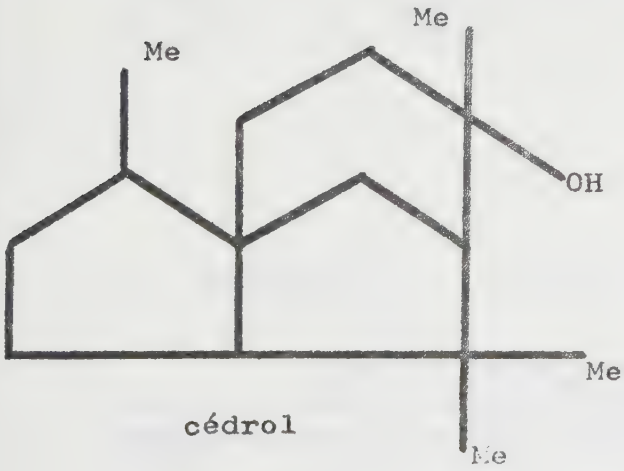
- très variable (voir tableau 10)

Le pourcentage des différentes espèces chimiques qui composent une essence de cyprés varie (7) Certaines espèces chimiques pouvant être totalement absentes dans plusieurs types d'essence.

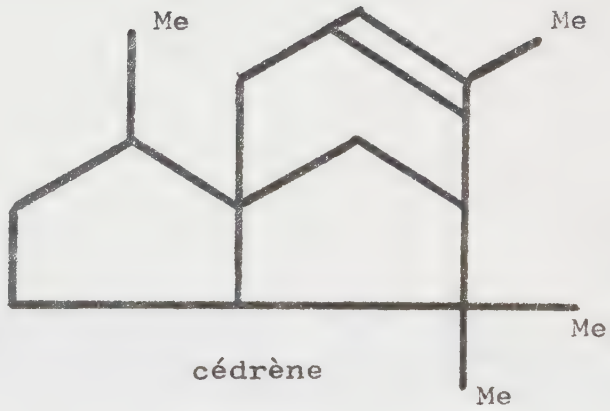
4.- Travaux divers -

Cedrène - Cédrol (19)

La synthèse totale du cédrol et du cédrène a été réalisée et contrôlée par STORK.



cédrol

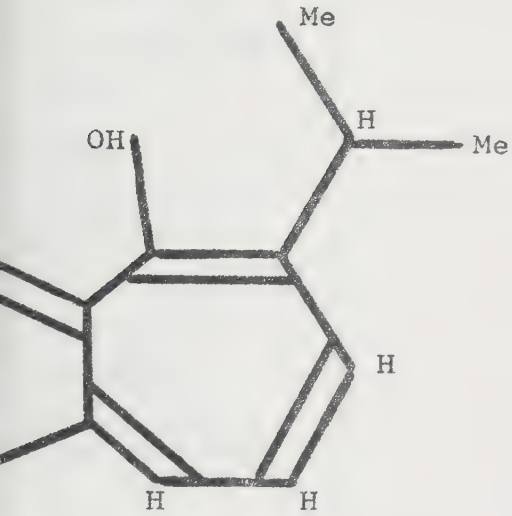


cédrène

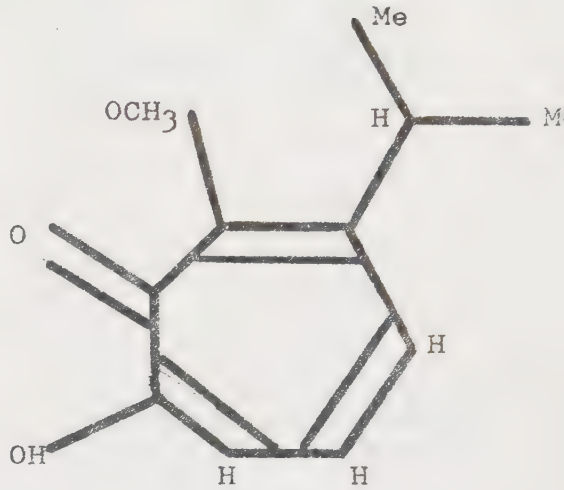
Au moyen de réactions chimiques simples, STORK a démontré que l'on pouvait facilement passer de l'un de ces composés à l'autre et réciproquement.

Fraction tropolonique (26)

ZAVARIN et ANDERSON, s'intéressant plus particulièrement à la fraction tropolonique, ont établi les structures de la pygmaéine et de l' α - thujaplicinol.



α - Thujaplicinol



Pygmaéine

5.- Pharmacologie -

Depuis fort longtemps, les extraits essentiels du cyprés sont utilisés comme moyens thérapeutiques, par exemple comme anti-tussifs (Suppl. Pharmacop. all., 1941) sous forme de soluté au 1/4 (11).

6.- Industrie -

Les extraits essentiels de cyprés, outre leurs emplois dans l'industrie pharmaceutique, trouvent de nombreuses applications dans les fabrications de parfums et de cosmétiques (9).

- Tableau I a -

Composition Chimique des Extraits de Cyprés
(var. Stricta. Ait., Pyramidilis, Horizontalis)
(1, 4, 5, 7, 9, 11, 17, 18, 21, 23, 26)

	Pousses et jeunes feuilles	
	Volatil	non volatil
Hétérosides		saponosides
Chlorophylle		phytol (part.porphyrine)
β & γ-carotène		oui
Tannins		tannins condensés 2 à 6 %
Tannins hydrolysables		non
Catéchines		oui
Anthracènosides		non
Flavonosides		non
Alcaloïdes		non
Acides orga. (ou leurs est.)		formiq.,lauriq.,caproïq. butyriq.,proprioniq., ascorbiq.,widdroniq. ($C_{15}H_{22}O_2$)
Sels		non spécifiés
Sucres		non spécifiés
Cellulose		oui
Amidon		oui
Lignine		oui
Alcools 0.2 à 2 %	14.8% -ols(type $C_{10}H_{18}O$), l-terpinène-4-ol,-ol non ident.(od.de rose),d-α & d-γ-terpinéol,-ol sesquiterp.$C_{15}H_{26}O$ non ident., cédrol,CH_3OH,-ol 3°Widdrol $C_{15}H_{26}O$,borneol,citronnel-ol,3-octanol.	
Cétones	-one non ident.(od.de menthone & thujone),diacétyle, -ones div.non ident., camphre.	
Aldéhydes	furfural,diméthylglyoxal, -als div. non ident.	
Terpènes (d- -pinène = 60 à 80% de la fraction terpénique)	dipentène,sabinène,d-limonène,myrcène,α & γ -terpinène,fellandrène,camphène, d-α -pinène,fenchène,d-sylvestrène,Δ3carène,p-cymène l-cadinène,Widdrène $C_{15}H_{24}$ γ-carotène,sesquit.non id.	

- Tableau I b -

Composition Chimique des Extraits de Cyprés

(var. Stricta. Ait., Pyramidilis, Horizontalis)
(1, 4, 5, 7, 9, 11, 17, 18, 21, 23, 26)

	Bois	
	volatil	non volatil
Hétérosides		
Chlorophylle		
β & γ-carotène		
Tannins		
Tannins hydrolysables		
Catéchines		
Anthracinosides		
Flavonosides		
Alcaloïdes		
Acides orga. (ou leurs est.)		cupressique, isocupressique, communique
Sels		
Sucres		
Cellulose		oui
Amidon		
Lignine		oui
Alcools		torulosol, manool, dolabrinol, hydronootkatinol
Cétols		thujaplicinol, pygmaéine, isopygmaéine
Aldéhydes		Torulosal
Terpènes		

b) Composants de la fraction non volatile -

1.- Fraction tannique -

Les galbules du cyprés sont riches en tannins polycondensés, mais la présence de tannins hydrolysables n'a pu être décelée (11).

Pharmacologie

Dés l'antiquité, le cyprés fut préconisé pour ses effets astringents et le pouvoir vaso-constricteur que les galbules doivent à leur tannin.

Ces propriétés toni-veineuses ont pu être comparées à celles de l'Hamamélis Virginica, bien que plus marquées et plus constantes (21), (17).

En outre, ces tannins possèdent des propriétés anti-putrides analogues à celles des tannins utilisés pour le traitement des peaux.

Les tannins officinaux sont moins actifs et moins bien tolérés que les tannins physiologiques, combinés à l'état naturel à d'autres éléments (mucilagineux, amers, aromatiques), qui corrigent leur action et les rendent plus assimilables par voie digestive.

Eléments de la structure végétale

Les diverses études qui ont été effectuées sur la structure végétale du cyprés ont permis d'identifier et de classer un grand nombre de constituants :

Hétérosides (Saponosides)

Chlorophylle

β et γ - Carotène

Catéchines

Acides organiques (laurique, glycolique, cupressique, etc ...)

- Tableau II -

Composition Chimique des Extraits de Cyprés

(var. Stricta. Ait., Pyramidilis, Horizontalis)
(1, 4, 5, 7, 9, 11, 17, 18, 21, 23, 26)

	Fruits	
	volatil	non volatil
Hétérosides		saponosides
Chlorophylle		phytol (part.porphyrine
β & γ-carotène		oui
Tannins		tannins condensés 2 à 6 %
Tannins hydrolysables		non
Catéchines		oui
Anthracinosides		non
Flavonosides		non
Alcaloïdes		non
Acides orga. (ou leurs est.)		glycoliq., glycériq., nitrate de terpényle et bornyle
Sels		non spécifiés
Sucres		non spécifiés
Cellulose		oui
Amidon		oui
Lignine		oui
Alcools 0.3 à 0,6 %	p-cimol, terpinéol-4, bornéol, cédrol	
Cétones	camphre, verbénone, cédranone	
Aldéhydes	citronnellal	
Terpènes	d-α & d-β pinène (60 à 80 % de la fraction terpénique), sabinène, Δ3 carène, cadinène, isofillocladène, cupressusène (sesquiterpène bicyclique)	

Cellulose

Amidon

Lignine

Alcools

Cétones

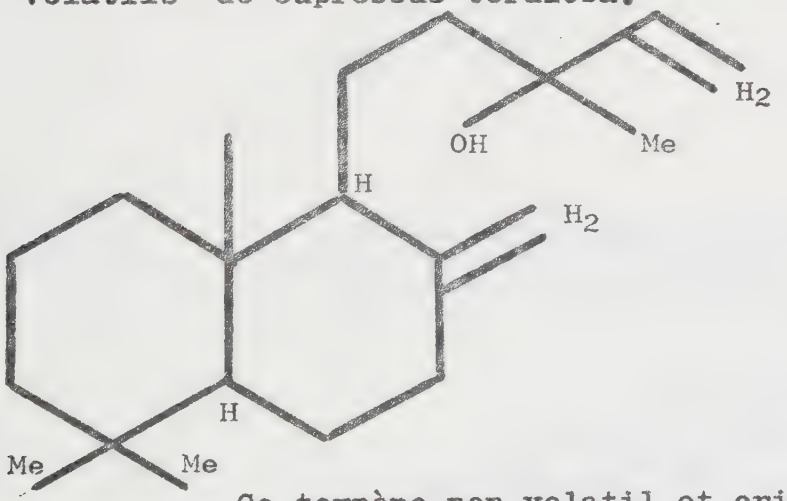
Les tableaux récapitulatifs (Tableaux I et II) donnent divers renseignements complémentaires à propos de ces différentes familles de composés.

Nous avons rassemblé ainsi, sous une forme simplifiée, les indications éparses relevées dans les publications des auteurs cités dans la bibliographie.

2.- Fraction terpénique -

Torulosol

Ce diol diterpénique a été identifié par H.S. BARRETO et C. ENZELL (23) à partir d'extraits non volatils de Cupressus torulosa.



Torulosol

$C_{20}H_{34}O_2$

P_f = 110 - 111°C

Ce terpène non volatil et cristallisable semble, par ailleurs, avoir été isolé par F. ROSSI et G. di MODICA à partir d'extraits de sciure de bois de Cupressus Sempervirens Lusitanica.

Leur extraction, que nous utiliserons par la suite, est menée de la façon suivante :

4 kg de sciure —(extraction / éther)→ 300 g d'extrait éthéré

—(distillation sous courant de vapeur)→

résidu non volatil —(extraction à l'éther / filtration)→ sol. éthérée

—(épuisé à 3 reprises par une sol. NaOH 20 % / décantation)→

produit décanté insoluble —(lavage à l'eau distillée / séchage sur sulfate sodique anhydre / distillation par solvant)→ 120 g résidu sec

—(chromatographie sur colonne d'alumine Woelm neutre / éluant : 1° éther de pétrole (2 1) 2° C_6H_6 3° éther)→

recueil des fractions éluées —(purification et recristallisation par mélange C_6H_6 éther de pétrole)→ 10 g de substance identifiée comme étant le torulosol

L'identification de la substance supposée être du torulosol a été effectuée.

Infra-Rouge

Les spectres infra-rouge de la substance à identifier et ceux du torulosol semblent superposables.

- bande à 3300 cm^{-1} attribuée à ν C - OH

- bandes à 1880 cm^{-1}, 995 et 910 cm^{-1} attribuées à δ C = CH_2

Ces spectres présentent, en outre, une grande analogie avec le spectre du manool ($C_{20}H_{34}O$).

Hydrogénation catalytique

L'hydrogénation catalytique sur l'oxyde de platine a permis de déterminer deux doubles liaisons.

Procédés analytiques

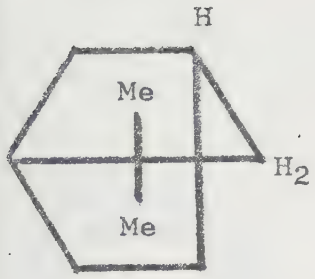
(voir Tableau III)

- Tableau III -

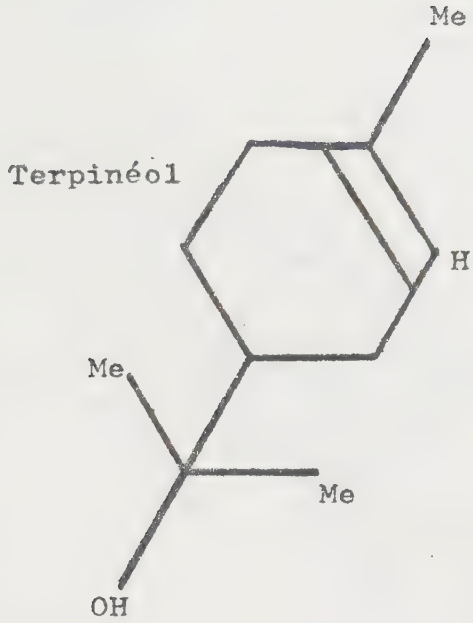
Procédés analytiques	Substance à identifier	Torulosol
Hydrolyse par KOH alcoolique	non hydrolysable	non hydrolysable
2-4 phénylhydrazine semi-carbazide	pas de réaction	pas de réaction
Méthode Zérévétinoff	2 H actifs	2 H actifs
Oxydation ozone	CH_3CHO (réactif de Schiff)	CH_3CHO (réactif de Schiff)
Aspect	cristaux tabulaires	cristaux
α_D^{25} ($CHCl_3$)	+ 24°	+ 31°
pt de fusion	112-114°C	110-111°C
formule brute	$C_{20}H_{34}O_2$	$C_{20}H_{34}O_2$
Solubilité		
Alcool	oui	oui
Ether	oui	oui
$CHCl_3$	un peu	un peu
C_6H_6	un peu	un peu
Ether pétrole	moyen	moyen
Eau	insoluble	insoluble

- Tableau IV -

Essences du cyprés

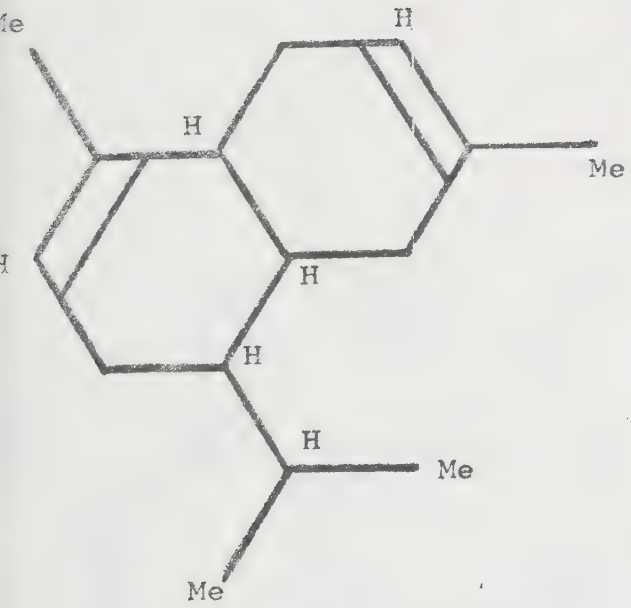


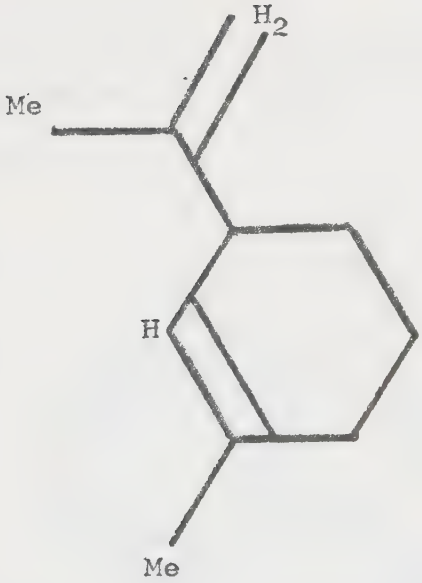
Camphène



Terpinéol

Cadinène

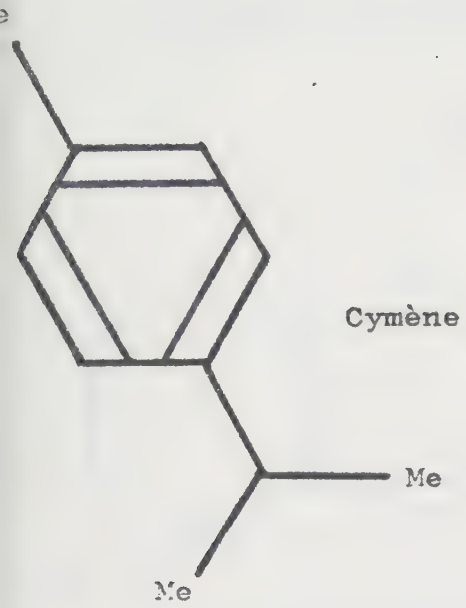




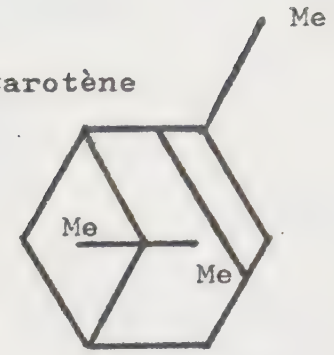
Silvestrène

- Tableau V -

Essences du cyprés



Cymène

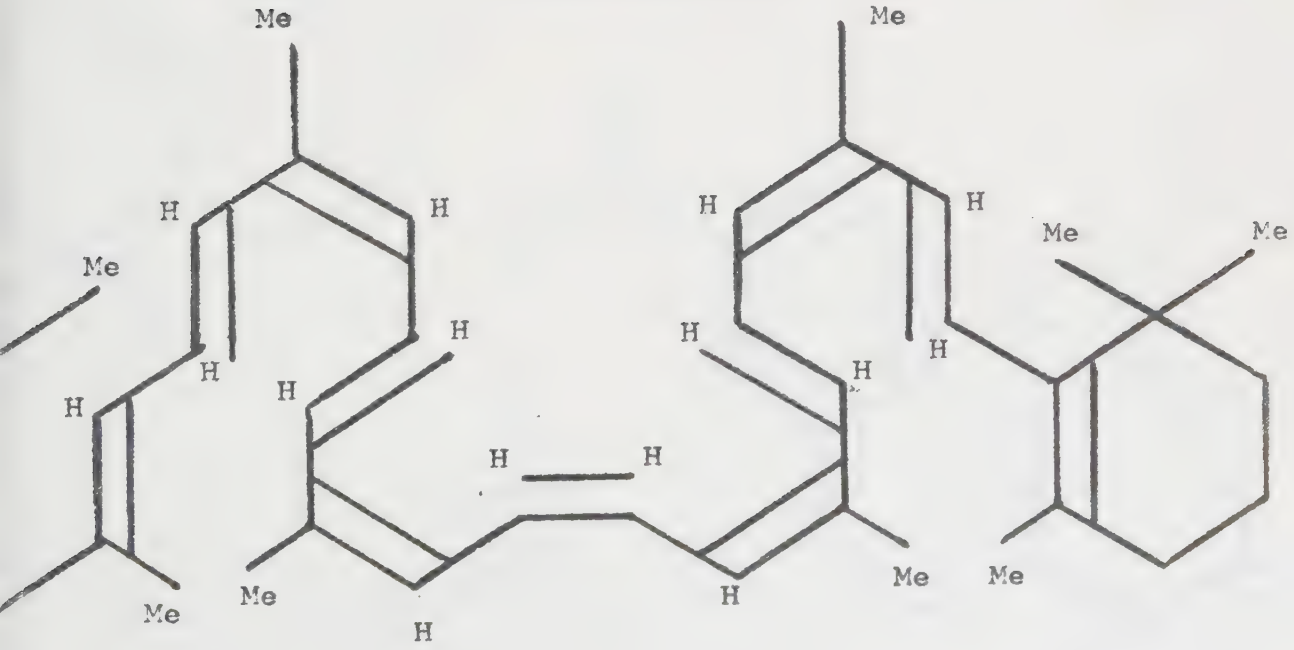


Carotène

Pigment du cyprés

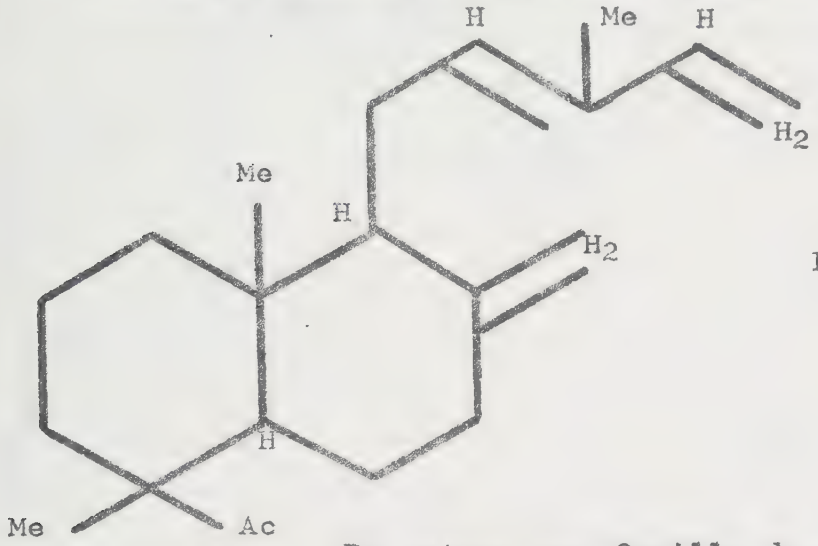
- carotène

(provitamine A)



Acides cupressique, isocupressique et communique

Ces acides, d'après L. MANGONI (18) sont les constituants majeurs de la fraction acide terpénique des extraits de bois de Cupressus Sempervirens.

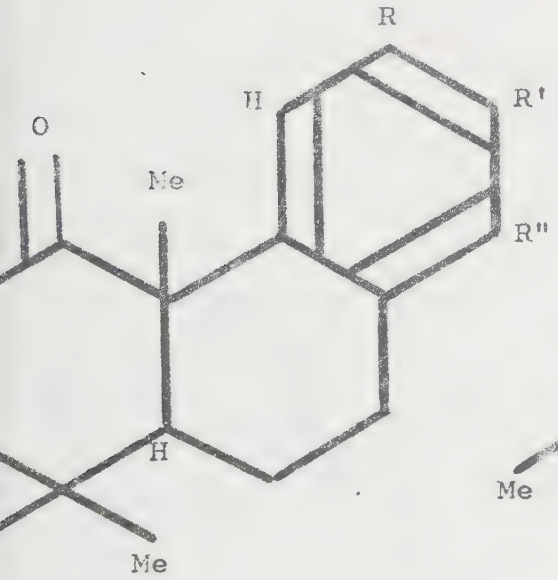


Acide communique

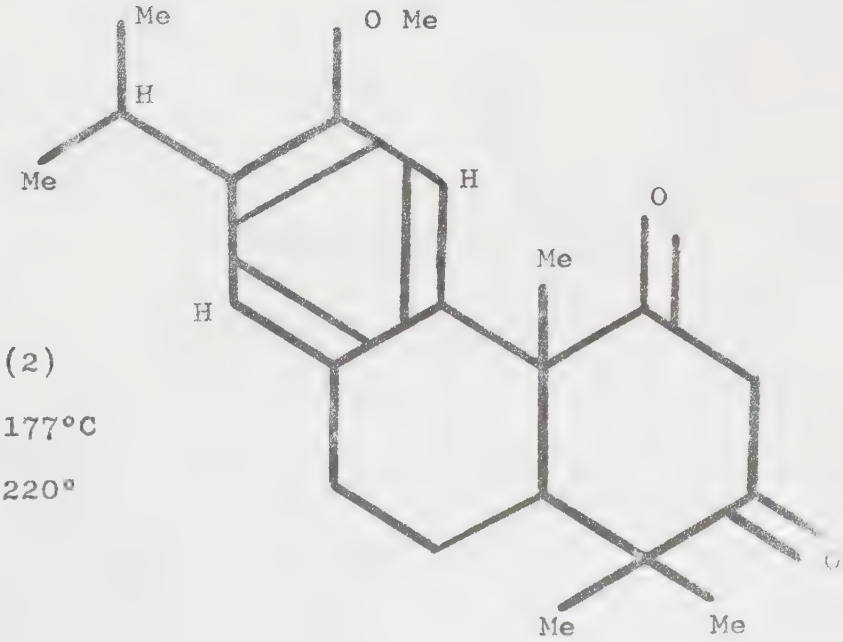
P_f (sel de Na) = 228-230°

$_D$ = + 25°

En outre, une famille de composés provenant de la même source aurait été identifiée, possédant comme formule développée générale,



(1) R = H, O Me, Isopr.
(2) R'= O Me, isopr., H
(3) R"= isopr., H, O Me



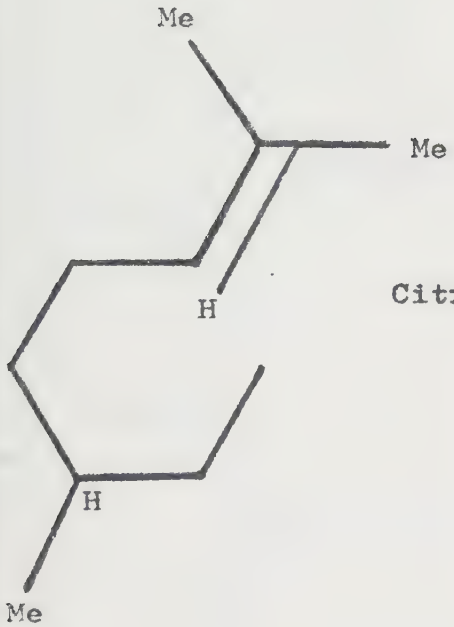
(2)

P_f 176-177°C

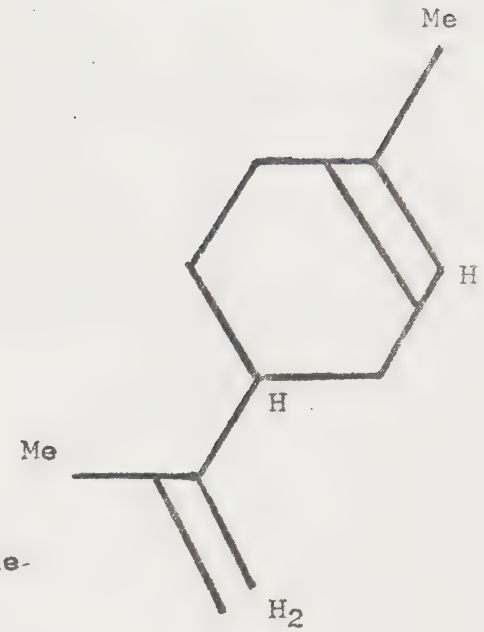
$_D$ = 220°

- Tableau VI -

Essences du cyprés

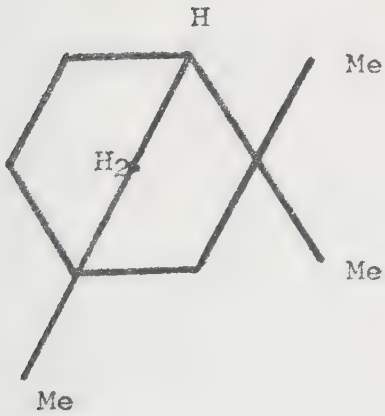


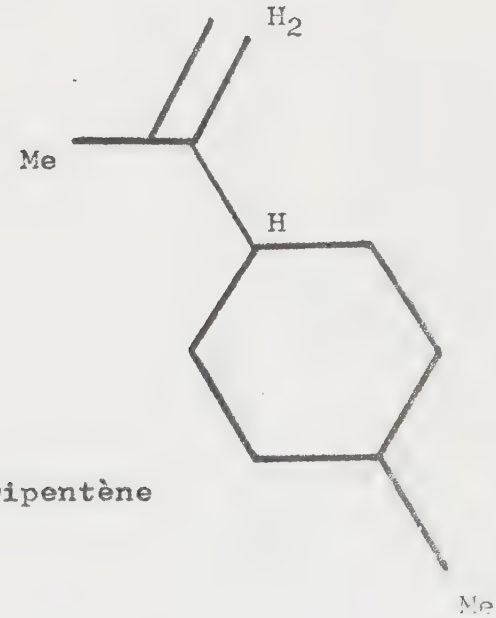
Citronellol



Limonène-

Fenchène

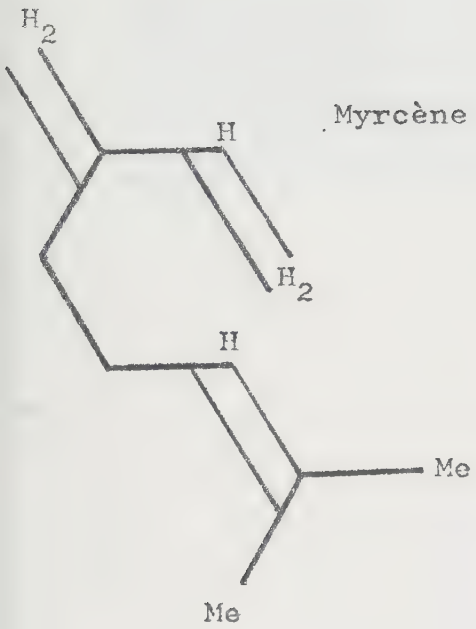




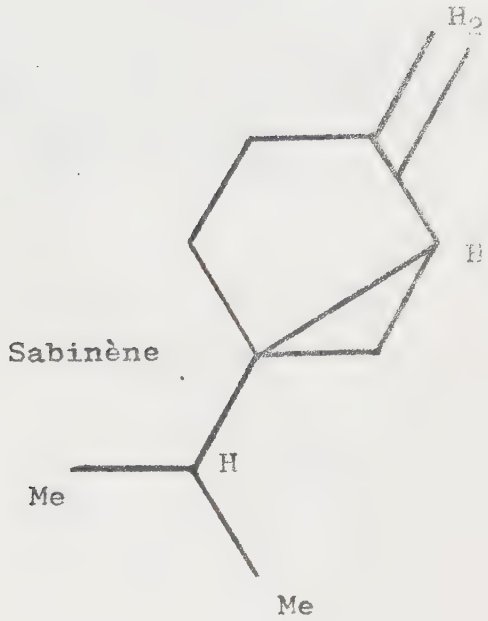
Dipentène

- Tableau VII -

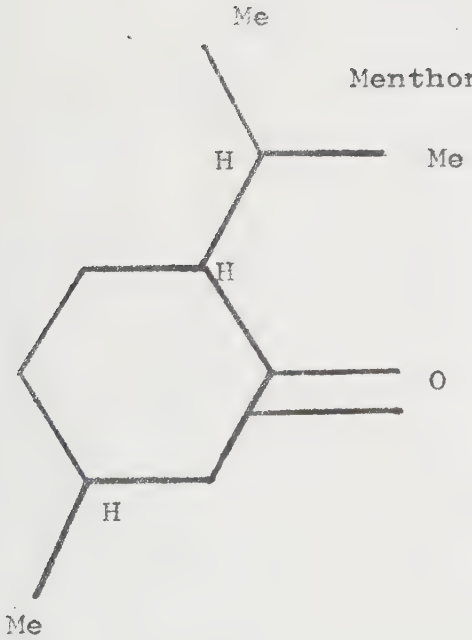
Essences du cyprés



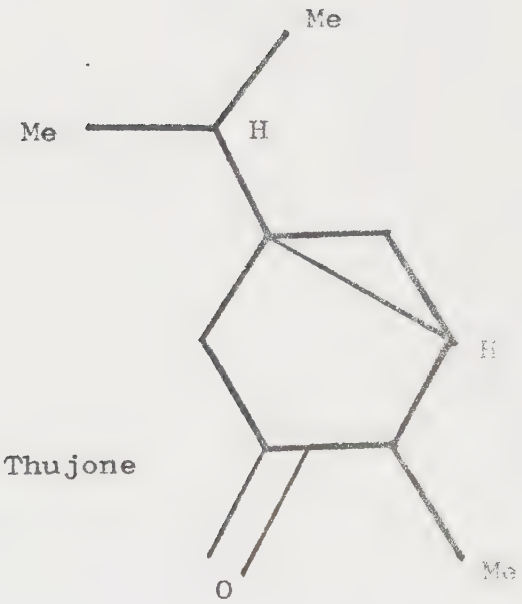
Myrcène



Sabinène



Menthone

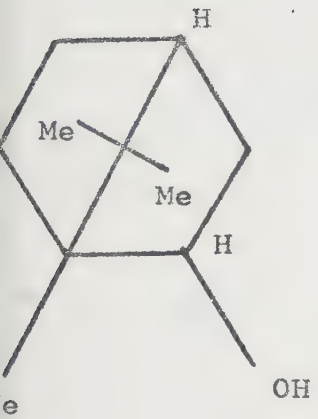


Thujone

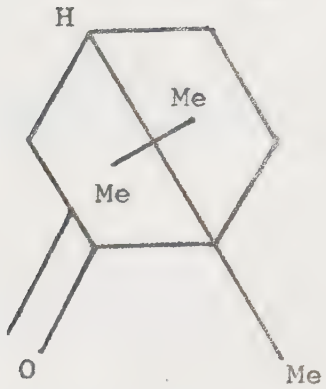
L'étude bibliographique nous a montré que les recherches les plus importantes avaient été effectuées principalement sur les extraits de bois et de feuilles (appareil végétatif) ainsi que sur les essences de cyprés, comme l'indique le tableau récapitulatif (10). Nous nous sommes intéressés plus spécialement à la fraction terpénique non volatile extraite des galbules (appareil reproducteur) du Cupressus Sempervirens, variété cyprés Italien.

- Tableau VIII -

Essences du cyprés

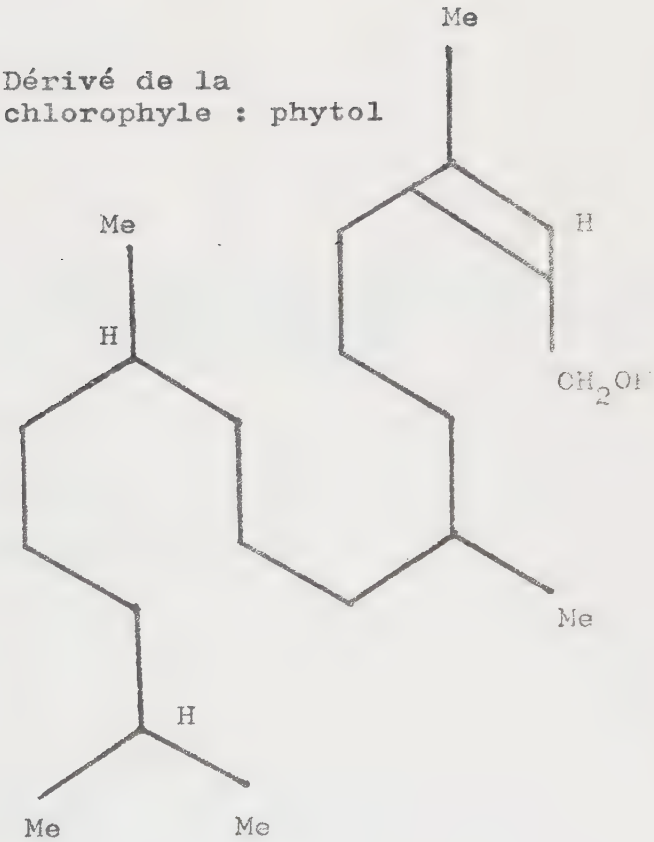


Bornéol

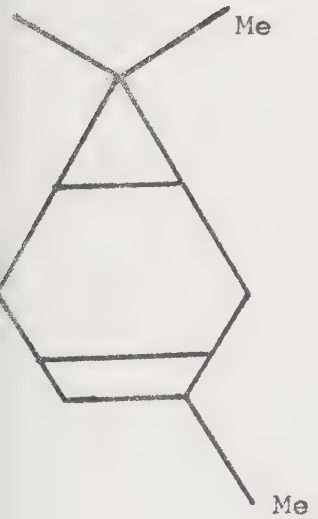


Camphène

Dérivé de la chlorophyle : phytol



$\Delta 3$-Carène



- PARTIE II -

ETUDE CHIMIQUE EXPERIMENTALE DES COMPOSANTS DE LA FRACTION NON VOLATILE DES EXTRAITS DE GALBULES DU CYPRES ITALIEN

Plan :

A - Préliminaires

B - Recherche et identification éventuelle du torulosol

1.- Extraction

2.- Purification

3.- Conclusion

C - Recherche, étude chimique, proposition d'identification des composants de la fraction non volatile à caractère acide

1.- Extraction

2.- Purification

3.- Identification

4.- Conclusion

--0--

- Préliminaires -

Une première investigation a consisté à rechercher ns les galbules du cyprés italien, la présence de Torulosol. et alcool sesquiterpénique bicyclique ayant déjà été identifié ns le bois comme nous l'avons indiqué précédemment).

Pour effectuer cette première phase de nos travaux, ıs avons utilisé la méthode d'extraction de P. FILIPPO et di MODICA (23) dont les détails sont décrits dans la partie II omposants de la fraction non volatile).

Il semble que nous n'ayons pas retrouvé cet alcool quantité notable dans les fruits du cyprés ; en revanche, e autre méthode d'extraction nous a permis d'isoler une fraction terpénique acide quantitativement importante.

- Recherche et identification éventuelle du Torulosol -

1.- Extraction -

Méthode :

a) Une lixiviation à l'éther de 20 kg de galbules fraîches, broyées, nous donne un extrait sec d'environ 300 gr.

b) Remis en solution dans 1,5 l d'éther et distillé sous courant de vapeur, cet extrait sec nous donne une masse visqueuse et brune, non volatile.

c) Après une extraction à l'éther (3 x 250 ml d'éther) et une filtration, nous obtenons une solution éthérée brune.

d) Nous épuisons cette solution par une solution de soude à 20 % (3 x 500 ml de solution de NaOH à 20 %). Nous procédons à une décantation et nous recueillons la partie insoluble.

e) Aprés avoir lavé le produit décanté avec de l'eau distillée, nous le séchons, dans un dessicateur sous vide, sur sulfate sodique anhydre pendant environ une semaine.

f) Nous remettons en solution ce résidu sec dans du méthanol pur et nous distillons sous pression réduite. Nous obtenons ainsi une dizaine de grammes de résidu sec.

g) La chromatographie sur colonne d'alumine Woelm neutre, à l'aide des éluants suivants,

1°) éther de pétrole,
2°) benzène,
3°) éther,

nous permet de recueillir un certain nombre de fractions éluées.

Nous les séchons et nous les purifions par le mélange benzène-éther de pétrole.

Nous obtenons ainsi une centaine de milligrammes de produits blanchâtres.

Contrôle chromatographique -

La chromatographie en couche mince sur gel de silice GF_{254} Merck des produits obtenus, mis en solution dans le méthanol pur Merck et élués par le mélange Benzène-méthanol (50 - 6), nous a permis d'observer que les différentes fractions étaient qualitativement à peu près semblable et composées d'un mélange de produits.

Dans tous les cas, nous obtenons de 7 à 10 spots, plus ou moins intenses, absorbants ou non en U. V., de Rf variant de 0,20 à 0,95.

2.- Purification -

La purification n'a pu être poursuivie quantitativement, les fractions obtenues n'atteignant pas le milligramme (malgré la forte quantité de matière première traitée au départ

3.- Conclusion -

Nous n'avons pas retrouvé dans les fruits du cyprés les mêmes rendements que ceux obtenus par F. ROSSI et G. di MODICA (23) à partir du bois.

Si les composés décrits par ces deux auteurs existent dans les galbules du cyprés italien, il semble que ce soit à l'état de traces.

Par contre, lors de la recherche du torulosol à partir de la fraction terpénique non acide extraite des galbules, la fraction terpénique acide non volatile résiduelle s'est révélée quantitativement importante. Il nous a donc semblé intéressant de l'isoler, de la purifier, et d'essayer d'en identifier les composants.

C - Recherche, étude chimique, proposition d'identification des composants de la fraction non volatile à caractère acide -

1.- Extraction -

La région provençale étant abondamment pourvue en plantations de cyprés italiens (cupressus sempervirens variété horizontalis et pyramidilis), il nous était facile

de trouver des quantités suffisantes de matière première fraîche, à partir desquelles nous avons obtenu nos extraits.

Dans le Vaucluse et les Bouches-du-Rhône, nous avons trouvé des galbules non matures, que nous avons récoltées de Mai à Septembre. En dehors de cette période, ces fruits sont ou bien insuffisamment développés ou lignifiés et une partie des composants chimiques s'oxyde ou se dénature (21).

Pour éviter ces mêmes inconvénients, nous avons été amenés à rechercher des méthodes d'extraction douces. Après quelques essais plus ou moins satisfaisants, nous avons fixé notre choix sur le protocole suivant :

Méthode :

a) A partir de 20 kg de galbules fraîches, finement broyées, nous avons procédé à une lixiviation à l'aide d'une solution méthanolique à 50 %.

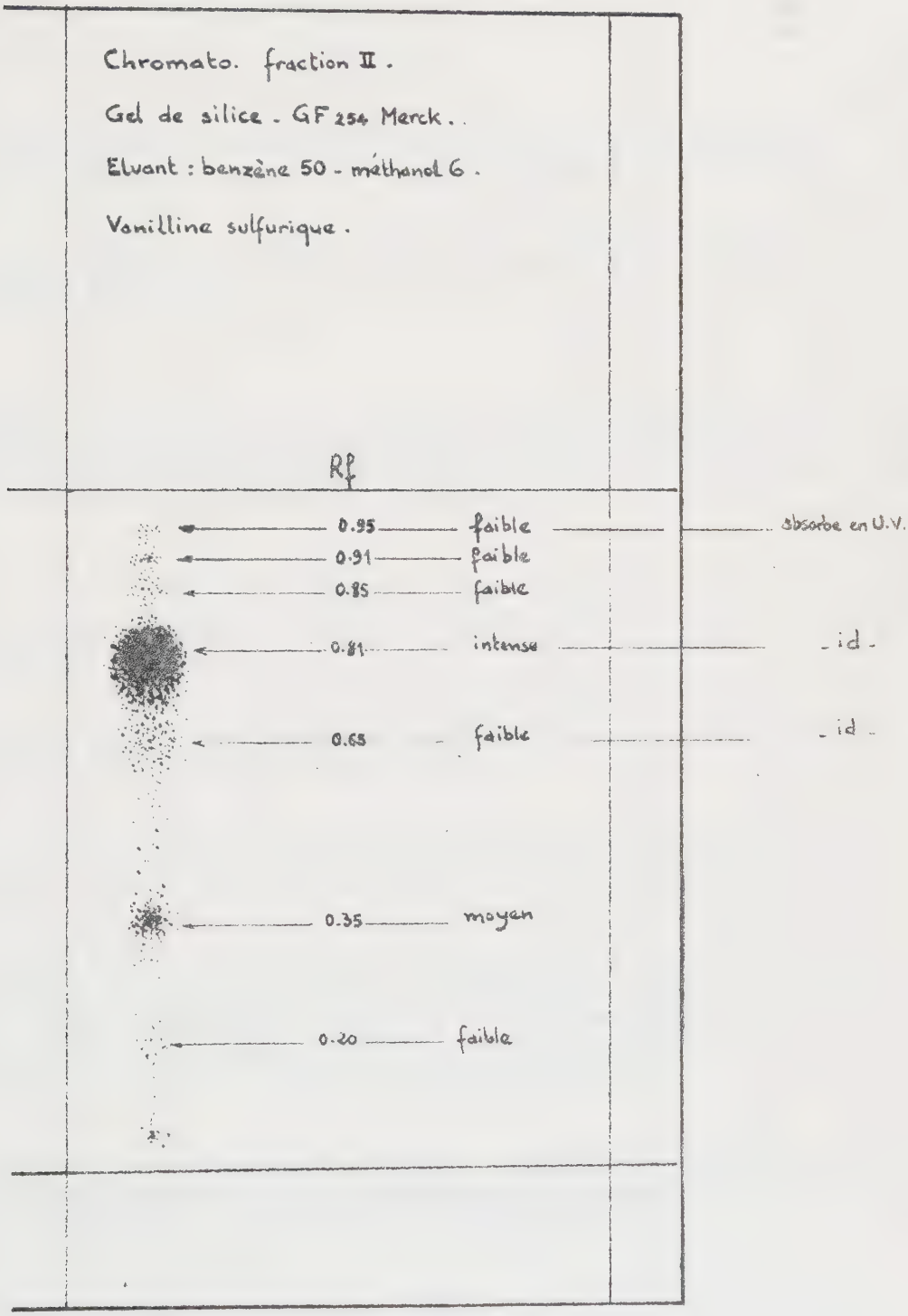
Nous éliminons ainsi une partie des fractions non terpéniques :

- Sels minéraux,
- Composés pectiques (glucides polycondensés du type polysaccharide),
- Mucilages,
- Acides aminés hydrosolubles,
- Tannins condensés.

b) Nous poursuivons la lixiviation en utilisant cette fois du méthanol pur.

Nous éluons jusqu'à ce que le lixiviat ne contienne plus de terpènes.

- Schéma 1 -


Chromato. fraction II.
Gel de silice - GF 254 Merck.
Eluant : benzène 50 - méthanol 6.
Vanilline sulfurique.
Rf
0.95 faible
0.91 faible
0.85 faible
0.81 intense
0.65 faible
0.35 moyen
0.20 faible
absorbe en U.V.
- id -
- id -

La fraction terpénique passe avec quelques pigments du type,

- chlorophylle,
- carotène.

c) Nous concentrons le lixiviat à 5 l, puis nous le plaçons dans un réfrigérateur à 0°C, pendant une semaine.

Nous observons, après cette décantation, un précipité verdâtre peu abondant.

d) Après filtration, la solution alcoolique est additionnée de 200 gr de charbon activé, puis filtrée à nouveau. La fraction obtenue est brune et limpide.

e) A cette solution, nous incorporons 20 % d'eau distillée.

Il se forme une suspension laiteuse que nous mettons à décanter à 0°C, pendant une semaine.

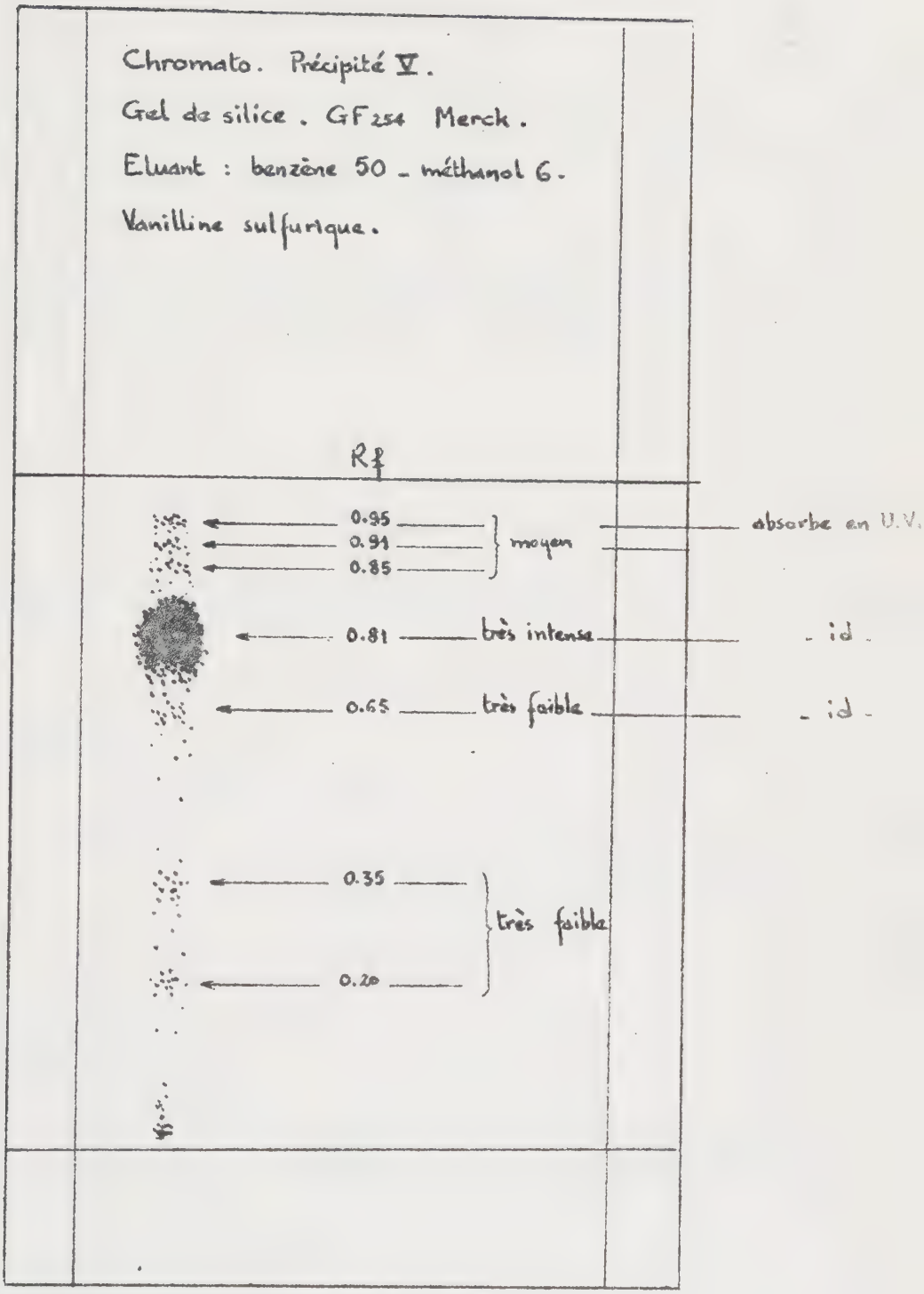
Nous obtenons un précipité (I) et un surnageant auquel nous ajoutons 20 % d'eau distillée après filtration.

Après une décantation d'une semaine à 0°C, nous obtenons un précipité (II) et un surnageant que nous filtrons et auquel nous ajoutons à nouveau 20 % d'eau distillée. Nous laissons la préparation encore une semaine à 0°C ; nous obtenons un précipité (III) et un surnageant.

Enfin, ce surnageant filtré, additionné de 20 % d'eau distillée et placé dans le réfrigérateur pendant une semaine donne une suspension (IV) qui ne précipite pas.

On sèche sous pression réduite les trois précipités et la suspension.

- Schéma 2 -


Chromato. Précipité V.
Gel de silice. GF254 Merck.
Eluant : benzène 50 - méthanol 6.
Vanilline sulfurique.
Rf
0.95
0.91
0.85
moyen
absorbe en U.V.
0.81
très intense
- id -
0.65
très faible
- id -
0.35
0.20
très faible

f) Les quatre fractions sont chacune épuisées par 500 ml d'éther en trois fois (200 ml + 200 ml + 100 ml) dans une ampoule à décanter.

g) Chacune de ces quatre solutions éthérées est mélangée à 2 gr de charbon activé, filtrée, concentrée sous vide et placée dans un dessicateur sous vide (élimination des fractions volatiles restantes).

Nous obtenons les produits suivants, correspondant respectivement aux précipités I, II, III et à la suspension IV que nous appelons : fractions I, II, III, IV.

- Fractions obtenues -

Les quatre fractions obtenues présentent des aspects différents et des rendements différents :

Fraction I

. rendement : 100 gr

. aspect : en partie cristallisée (cristaux blancs), en partie une masse de consistance visqueuse de couleur brun rougeâtre

Fraction II

. rendement : 45 gr

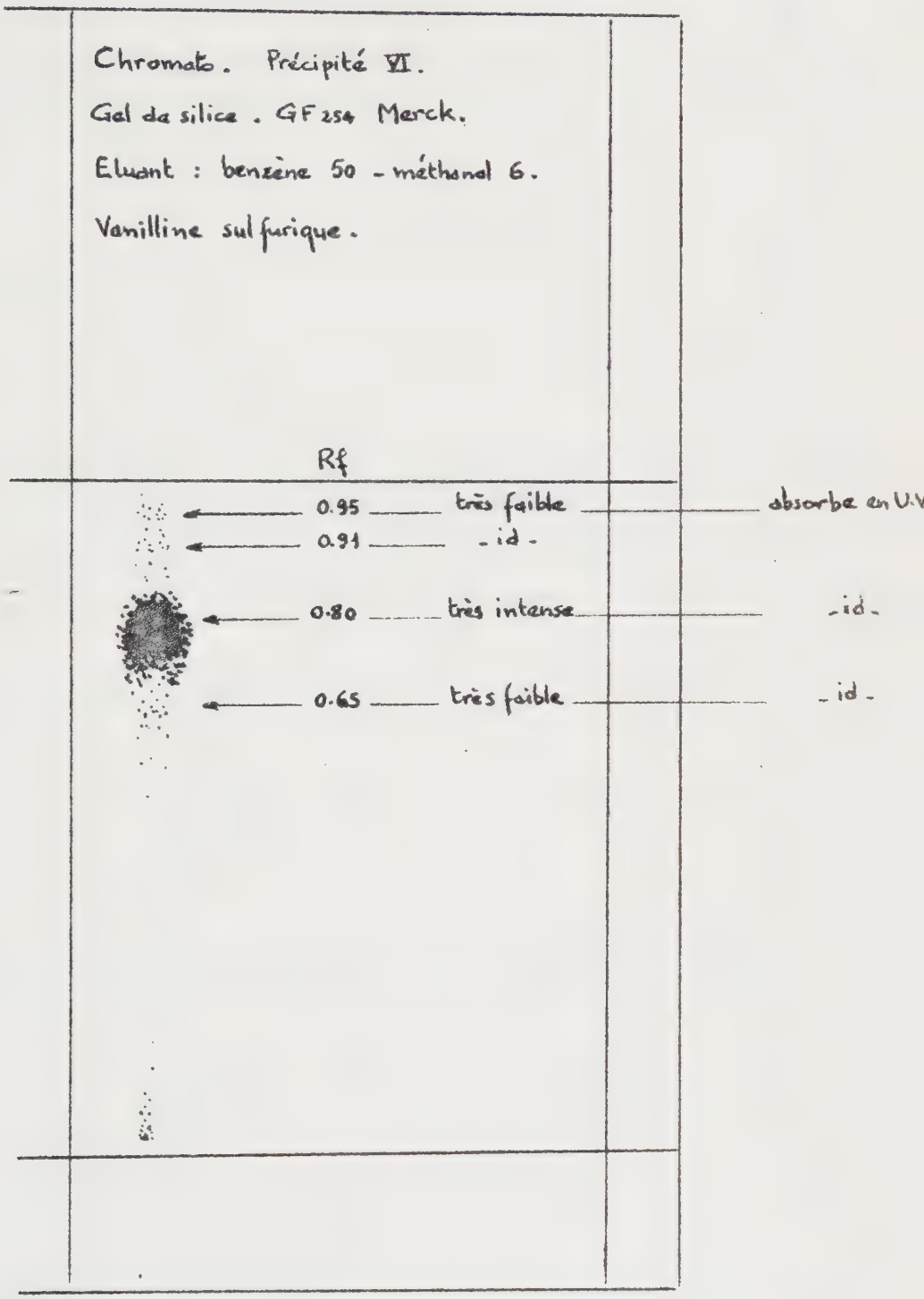
. aspect : masse de couleur blanchâtre en grande partie cristallisée

Fraction III

. rendement : 20 gr

. aspect : masse brun verdâtre clair, très visqueuse

- Schéma 3 -


Chromato. Précipité VI.
Gel de silice . GF 254 Merck.
Eluant : benzène 50 - méthanol 6.
Vanilline sulfurique.
Rf
0.95 très faible absorbe en U.V
0.91 - id -
0.80 très intense - id -
0.65 très faible - id -

Fraction IV

. rendement : 25 gr

. aspect : masse brune visqueuse

Nous nous sommes fixé comme étude, le fractionnement, a purification et la recherche d'identification des composants e ces quatre fractions.

.- Purification -

Méthode de contrôle :

Pour pouvoir suivre le fractionnement et la purifi-ation de ces quatre fractions, et après plusieurs essais de ifférents systèmes chromatographiques, nous avons choisi ne méthode de chromatographie en couches minces, sur plaque e Gel de silice GF_{254} Merck.

Quant aux solvants d'élutions, de bons résultats ont té obtenus avec le mélange :

Benzène 45
Méthanol 8
Acide acétique 4

Mais les meilleures élutions ont été obtenues avec es mélanges benzène-méthanol et plus précisément avec le élange :

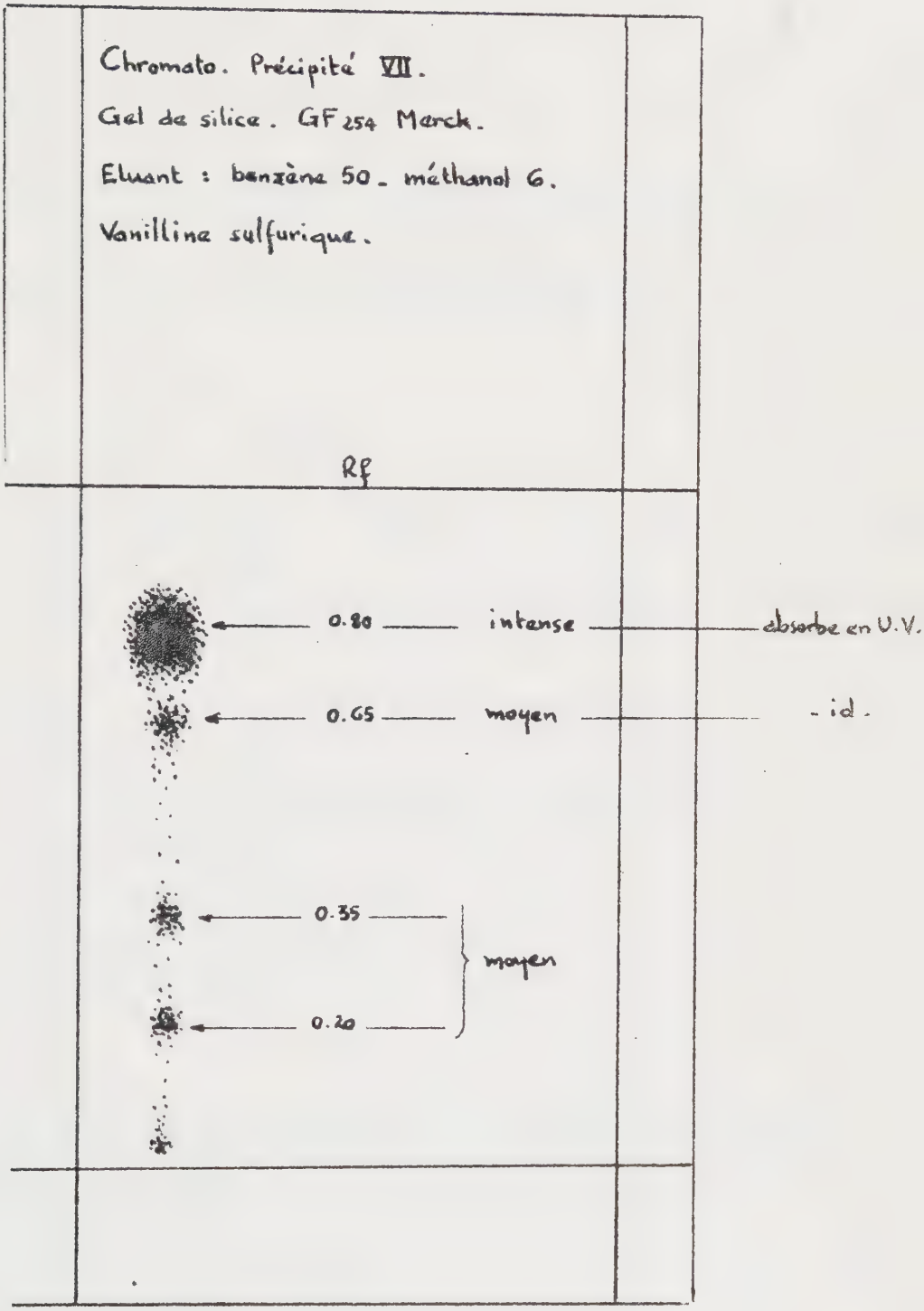
Benzène 50
Méthanol 6

Comme révélateur, nous avons utilisé :

Pentachlorure d'antimoine en solution dans le tétrachlorure de carbone :

. coloration des spots en brun orangé

- Schéma 4 -


Chromato. Précipité VII.
Gel de silice. GF 254 Merck.
Eluant : benzène 50 _ méthanol 6.
Vanilline sulfurique.
Rf
0.80
intense
absorbe en U.V.
0.65
moyen
- id.
0.35
0.20
moyen

- Vanilline sulfurique :

. coloration des spots en bleu violacé d'abord, coloration qui vire au brun en vieillissant.

- Fraction II -

La fraction II étant presque entièrement cristallisée et semblant la plus homogène des quatre fractions considérées, c'est à elle que nous nous sommes intéressés en premier lieu.

Soumise aux procédés de chromatographie en couche mince énoncés ci-dessus, la fraction II nous a permis d'observer (schéma I),

- ancien spot en lumière visible,

- 3 spots en U.V à 253 mμ

1 spot important, fluorescence bleue, Rf ~ 0,80-0,82

1 spot de faible intensité, Rf ~ 0,65

1 spot de faible intensité, Rf ~ 0,95

- 7 spots après pulvérisation de vanilline sulfurique,

les 3 spots fluorescents en U.V. prennent une coloration bleu violacée, de plus :

1 spot peu intense, Rf ~ 0,20

1 spot plus intense, Rf ~ 0,35

1 spot peu intense, Rf ~ 0,85

1 spot peu intense, Rf ~ 0,91

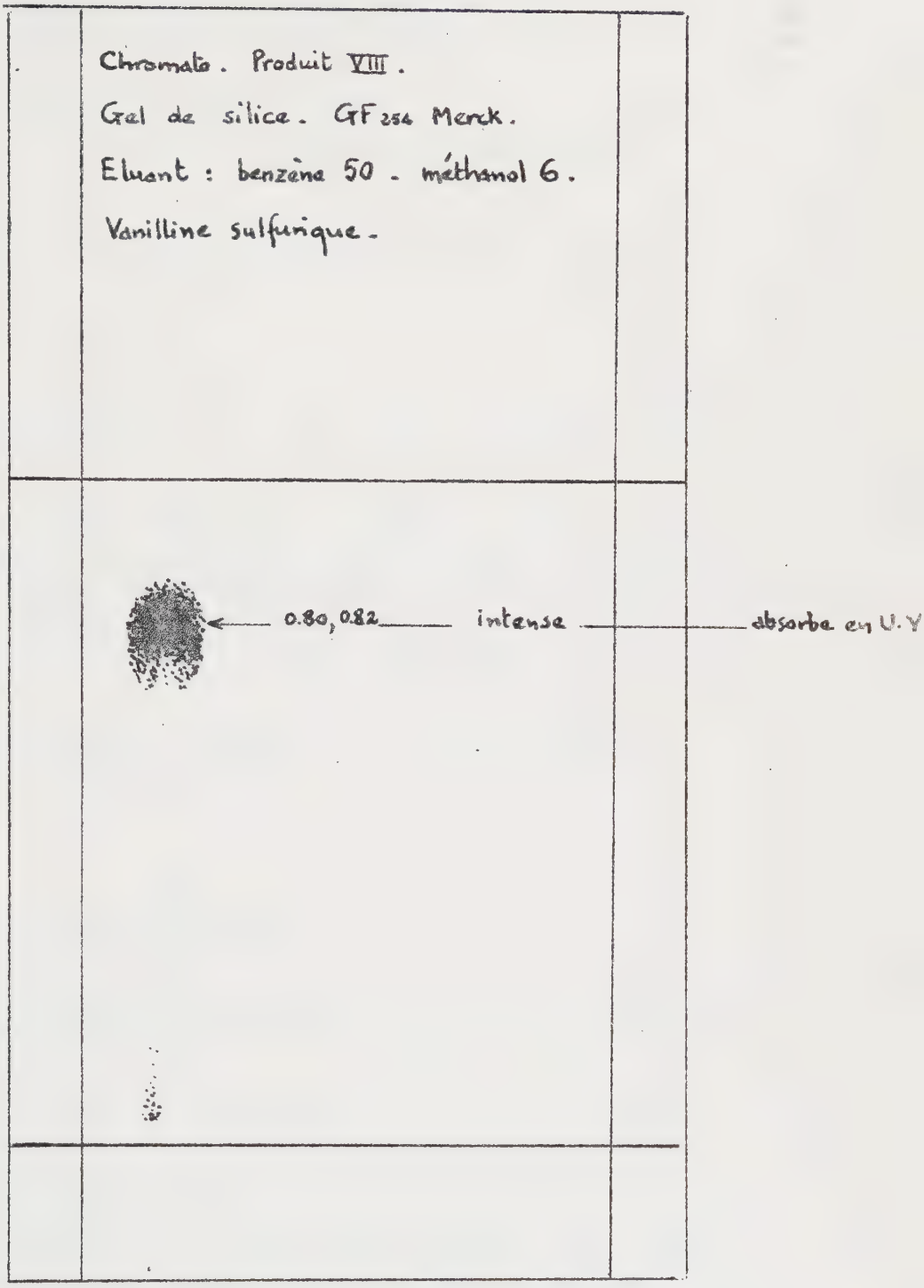
Le spot le plus intense et le plus important est celui de Rf ~ 0,80 - 0,82. Nous avons donc orienté la purification de façon à l'isoler.

- Méthode de purification -

a) Nous dissolvons 45 g de la fraction II dans 75 ml de méthanol pur Merck.

Nous incorporons 1 g de charbon activé et nous filtrons.

- Schéma 5 -


Chromato. Produit VIII.
Gel de silice. GF 254 Merck.
Eluant : benzène 50 . méthanol 6.
Vanilline sulfurique.
0.80, 0.82
intense
absorbe en U.V

b) Le filtrat est additionné de 18 ml d'eau.

Il se produit une précipitation.

Nous procédons à une décantation en deux parties et nous obtenons ainsi deux précipités :

- en début de décantation,
  . un précipité blanc grisâtre V

- en fin de décantation,
  . un précipité blanc VI

c) Le précipité VI est lavé par un mélange méthanol/eau 75/20.

La partie insoluble est séchée au dessicateur sous vide.

La partie soluble de couleur jaune ne précipite pas lorsqu'on ajoute 5ml supplémentaire d'eau distillée. Par addition d'eau distillée jusqu'à 25 ml, on obtient une solution trouble qui précipite peu à peu conduisant à deux nouvelles fractions :

- une partie cristallisée incolore VII
- une partie visqueuse de couleur brune

- Contrôle chromatographique -

L'étude chromatographique des précipités V, VI, VII nous a permis d'observer :

Précipité V - (schéma 2)

rendement : 20 g

C C M : 1 spot très intense, Rf ~ 0,80

3 spots au-dessus, intensité moyenne

3 spots au-dessous, très faible intensité (même avec des dépôts importants)

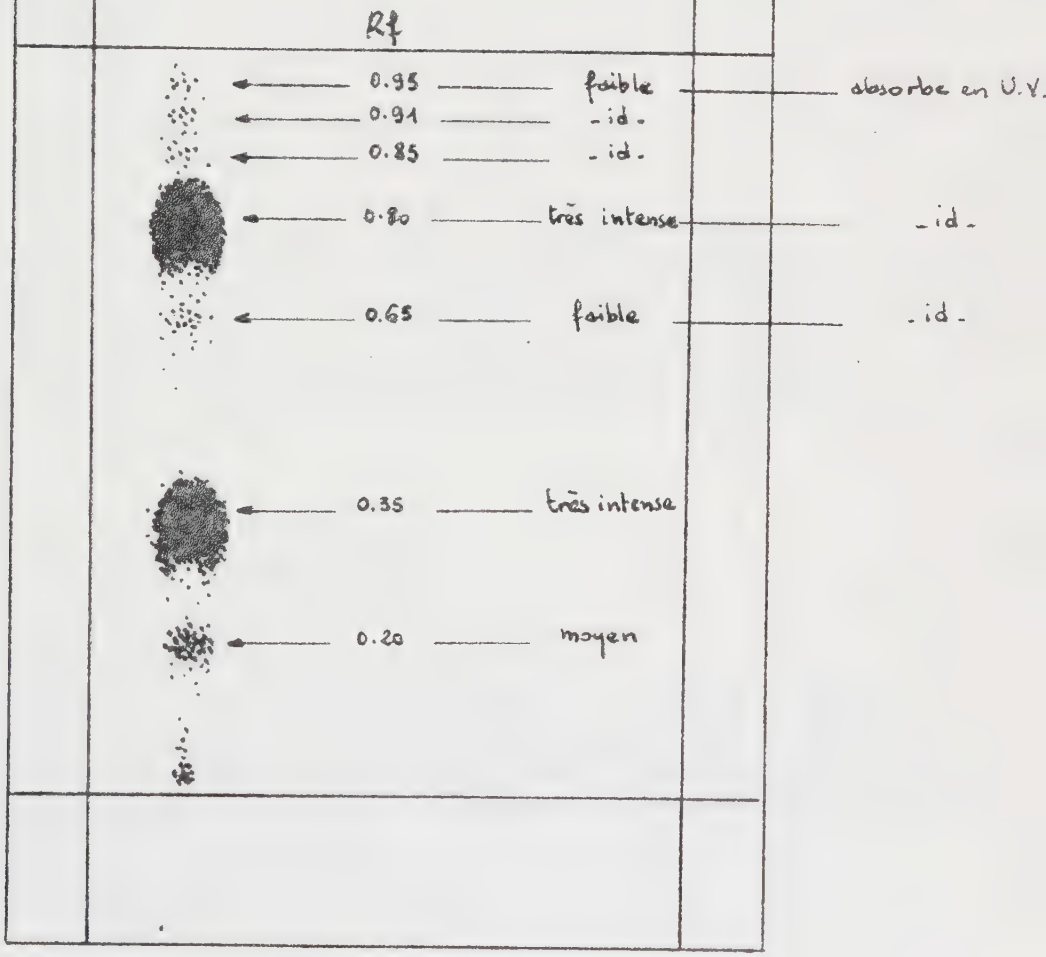
- Schéma 6 -

Chromato. Fraction III.

Gel de silice. GF 254 Merck.

Eluant : benzène 50. méthanol 6.

Vanilline sulfurique.



Précipité VI - (schéma 3)

rendement : 20 g

C C M : 1 spot très intense, Rf ~ 0,80

3 spots très légers, Rf ~ 0,91, 0,95, 0,65

Précipité VII - (schéma 4)

rendement : 5 g

C C M : 1 spot important, Rf ~ 0,80

3 spots assez intenses, Rf ~ 0,20, 0,35, 0,65

Le précipité VII, quantitativement peu abondant, a été laissé de côté du fait que les spots secondaires sont beaucoup plus abondants dans la fraction III comme nous le verrons ultérieurement.

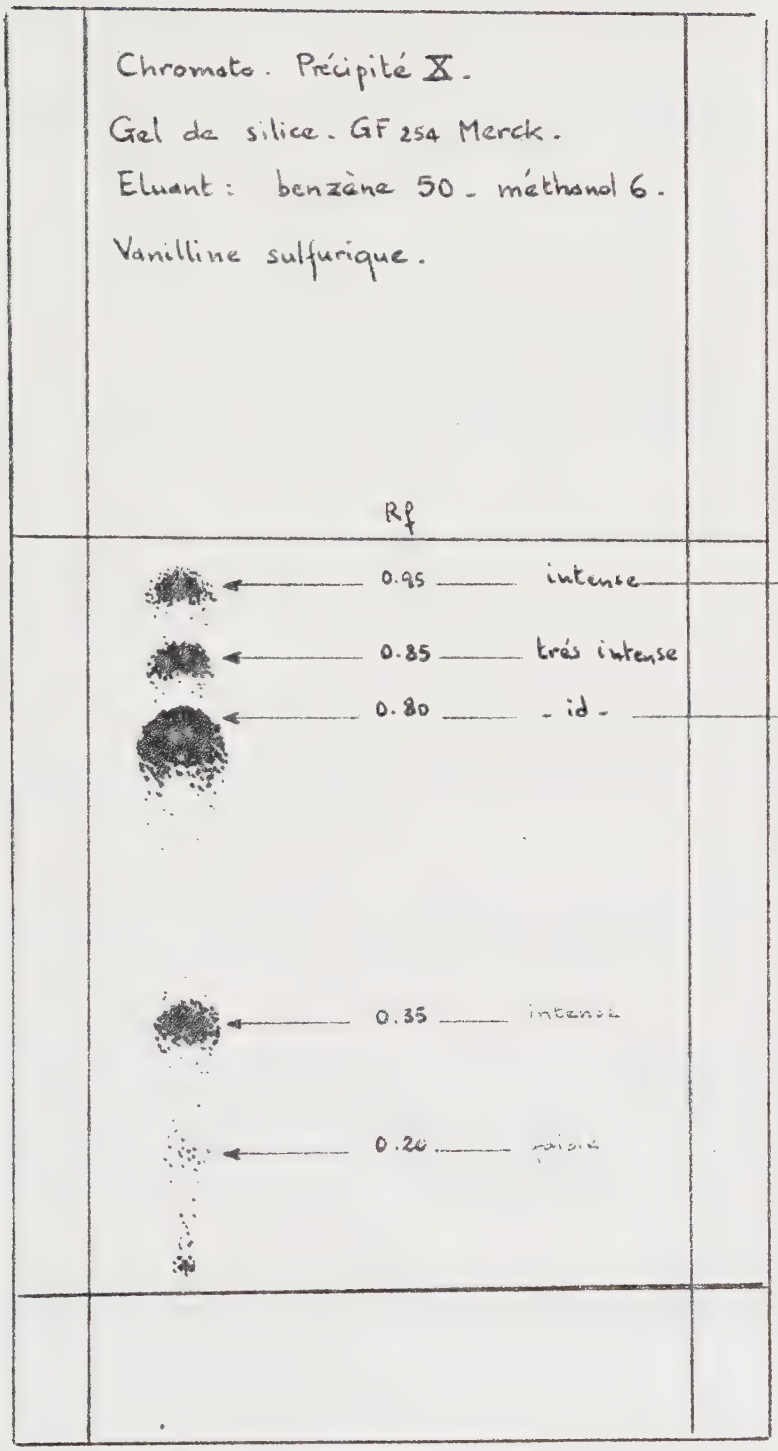
Nous nous sommes donc attachés à la purification du corps correspondant au spot de Rf = 0,80.

Pour cela, nous avons traité les précipités V et VI. Nous avons multiplié les précipitations par le mélange méthanol/eau, en lavant les précipités obtenus par le mélange méthanol/eau servant à leur précipitation. Nous avons pu ainsi isoler 15 g d'un corps ne donnant en chromatographie en couche mince qu'un spot de Rf ~ 0,80 - 0,82, quelle que soit la concentration du dépôt. Nous appelons ce corps : Produit VIII. (schéma 5).

- Caractéristiques du produit VIII -

Corps cristallisé
Insoluble dans l'eau distillée
Soluble dans les solvants organiques usuels (méthanol, éthanol, acétone, éther, chloroforme, tétrachlorure de carbone, hexane, benzène, éther de pétrole)
Corps insoluble dans les solutions aqueuses ammoniacales et sodiques
Soluble dans les solutions aqueuses potassiques
Reprécipite par acidification
Chromatographie couche mince = spot Rf ~ 0,80 - 0,82

- Schéma 7 -


Chromato. Précipité X.
Gel de silice. GF 254 Merck.
Eluant : benzène 50 - méthanol 6.
Vanilline sulfurique.
Rf
0.95 intense absorbe en U.V.
0.85 très intense
0.80 - id - - id -
0.35 intense
0.20 faible

- Fraction III -

Cette fraction de couleur brun-verdâtre clair, soumise aux mêmes conditions chromatographiques que celles employées pour la fraction II, nous montre (schéma 6) :

- 1 spot très intense de Rf $\sim$ 0,80 correspondant au produit VIII que nous avons isolé précédemment
- 1 spot très intense de Rf $\sim$ 0,35 - 0,38 que nous avons déjà mentionné lors de l'étude chromatographique en couche mince du précipité VII
- 1 spot moins intense de Rf = 0,20
- Divers spots diffus, très faibles, de Rf correspondant à ceux mentionnés sur les chromatographies précédentes.

- Méthode de purification -

a) Nous reprenons cette fraction III par 150 ml de $CHCl_3$.

b) Après filtration, nous traitons le soluble $CHCl_3$ par 300 ml d'éther de pétrole.

c) Après quelques jours à 0°C, nous obtenons la décantation d'un dépôt jaune brunâtre que nous appellerons : Précipité IX, et un surnageant.

d) Nous concentrons le surnageant à 50 ml, après l'avoir filtré et nous lui additionnons 100 ml d'éther de pétrole. Nous obtenons ainsi un précipité brun orangé visqueux que nous lavons avec de l'éther de pétrole et un surnageant. Nous désignons le précipité : Précipité X.

e) Nous séchons le surnageant, sous pression réduite, et nous obtenons un résidu visqueux, jaune clair, que nous appelons Résidu XI.

Dans ces trois fractions : précipité IX, précipité X, résidu XI, et dans les mêmes conditions chromatographiques (utilisation de la vanilline sulfurique comme révélateur) nous avons observé, qualitativement les mêmes spots que dans la fraction II.

- Schéma 8 -

Chromato. Résidu XI.

Gel de silice. GF254 Merck.

Eluant : benzène 50 - méthanol 6.

Vanilline sulfurique.

Rf		couleur
0.95	faible	coloré [illegible]
0.93	intense	
0.90	id.	id.
0.85	id.	id.
0.35	id.	
0.05	faible	
0.2	faible	

Cependant, quantitativement et principalement dans le précipité X et le résidu XI, nous avons observé un spot intense de Rf $\sim$ 0,32 - 0,35.

Comme nous avons déjà isolé le corps de Rf $\sim$ 0,80, la purification du précipité IX ne nous a pas semblé d'un grand intérêt dans le cadre de notre présent travail.

Nous nous sommes donc plus spécialement attachés à traiter le précipité X et le résidu XI. Pour cela, nous avons utilisé deux protocoles différents.

Précipité X - (schéma 7)

rendement : 3 g environ

C C M = absorbe en U.V	1 spot intense de Rf $\sim$ 0,90-0,91 2 spots très intenses de Rf $\sim$ 0,80-0,85
n'absorbe pas en U.V	1 spot intense de Rf $\sim$ 0,32-0,35 1 spot peu intense de Rf $\sim$ 0,25 1 spot peu intense de Rf $\sim$ 0,20

1º Méthode de purification -

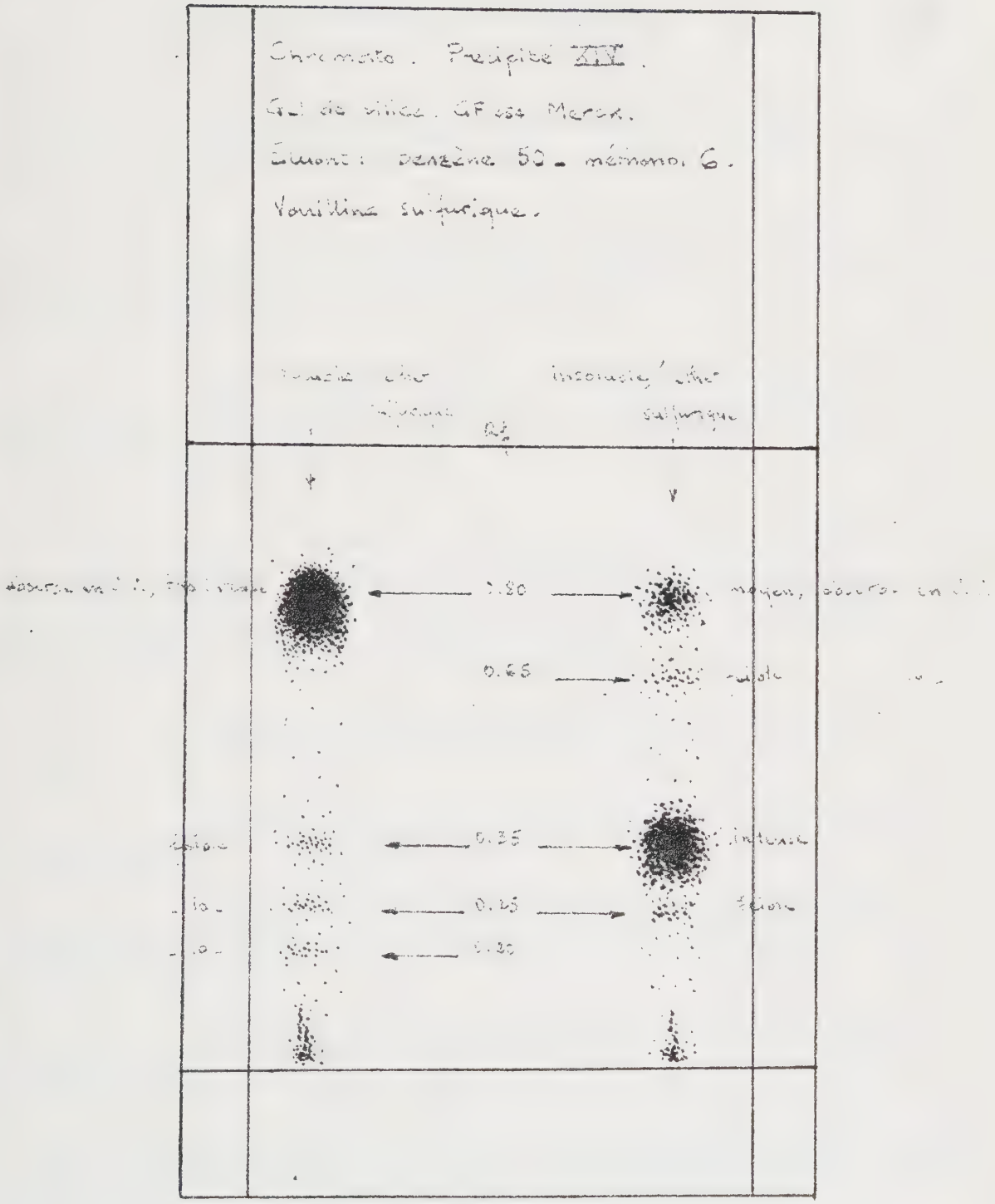
Nous reprenons cette fraction par du méthanol pur et nous soumettons cette solution alcoolique à des précipitations successivement, à l'aide d'eau distillée (4 x 20 % H_2O).

Nous effectuons ainsi quatre précipitations successives.

Les trois premières précipitations nous ont conduit à des masses brunes et visqueuses avec, du premier au troisième précipité, un enrichissement progressif du spot de Rf $\sim$0,32-0,35

La quatrième addition d'eau distillée, nous conduit à une suspension blanchâtre.

- Schéma 9 -


Chromato. Précipité XII.
Gel de silice. GF 254 Merck.
Eluant : benzène 50 - méthanol 6.
Vanilline sulfurique.
0.80
0.65
0.35
0.25
0.20

Nous concentrons cette suspension, sous pression réduite, afin d'éliminer le méthanol et éviter ainsi son rôle de tiers solvant.

Cette précaution nous permet d'effectuer une extraction à l'éther de cette suspension (3 x 100 cm^3 éther).

Nous concentrons, sous pression réduite, cette solution éthérée que nous épuisons à trois reprises par 50 cm^3 d'eau ammoniacale à 20 %.

La solution ammoniacale est alors acidifiée par une solution d'acide chlorhydrique N jusqu'à pH = 2 et épuisée à nouveau par trois fois 25 ml d'éther.

La solution éthérée est séchée sous pression réduite. Le résidu est repris par 25 cm^3 d'un mélange 1/1 en volume de benzène et d'éther de pétrole. On ajoute alors quelques gouttes d'ammoniaque.

Après agitation de quelques minutes dans un bain de glace pilée, on obtient un précipité cristallin. On filtre ce précipité, on le lave avec 10 cm^3 d'éther sulfurique, on le sèche et on obtient un produit de couleur sable rose avec un rendement pondéral de 700 mg environ.

Ce produit est solubilisé par une solution d'hydroxyde de potassium à 20 % et filtré.

On neutralise le filtrat par une solution d'acide chlorhydrique N jusqu'à pH = 7.

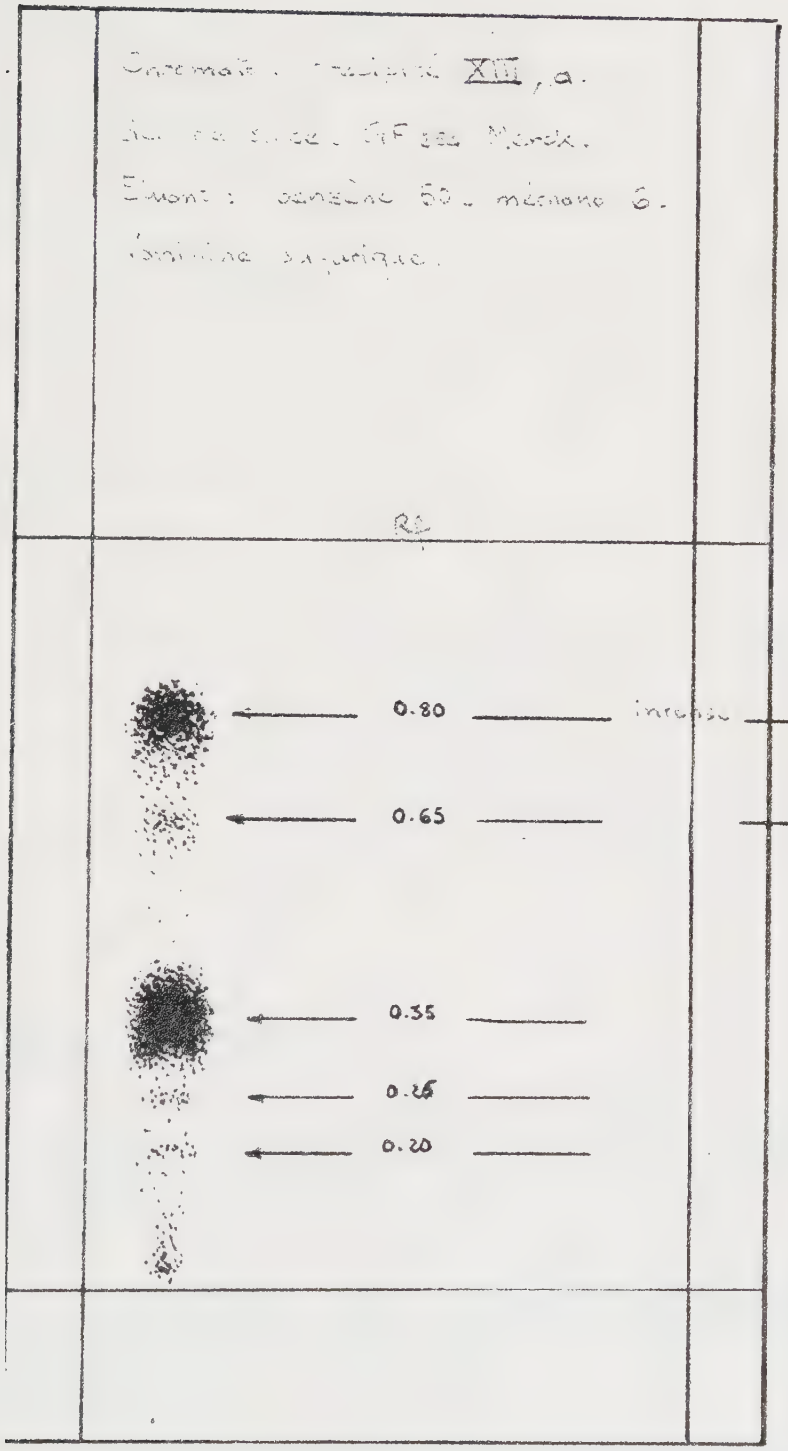
On obtient un premier précipité qu'on lave à l'eau distillée et une partie soluble. Le produit obtenu est un résidu blanc crème.

La partie soluble est additionnée à nouveau d'une quantité de solution d'acide chlorhydrique N jusqu'à pH = 2.

Le précipité obtenu ainsi est blanc, cristallisé après lavage à l'eau distillée et séchage dans un dessicateur sous vide. Le rendement est inférieur à 100 mg.

Nous appellerons ce précipité : Produit XII.

- Schéma 10 -



- Caractéristiques du produit XII -

Insoluble dans l'eau (forme acide)

Insoluble dans l'éther sulfurique (forme sel d'NH_4^+)

Insoluble en milieu acide

Soluble dans les solutions ammoniacales, sodiques et potassiques

Blanc et cristallisé (forme acide)

Chromatographie couche mince :

1 spot intense Rf ~ 0,32 - 0,35 (forme acide)

Soluble dans éther sulfurique (forme acide)

Résidu XI (schéma 8)

rendement : 2 g environ

C C M : 1 spot peu intense de Rf ~ 0,95
2 spots intenses de Rf ~ 0,80-0,85
1 spot intense de Rf ~ 0,65
1 spot intense de Rf ~ 0,32-0,35
2 spots très peu intenses de Rf ~ 0,20-0,25

2° Méthode de Purification -

Notre but étant également d'isoler quantitativement le produit de Rf ~ 0,32-0,35, nous avons en partie repris le procédé de purification utilisé pour le précipité X.

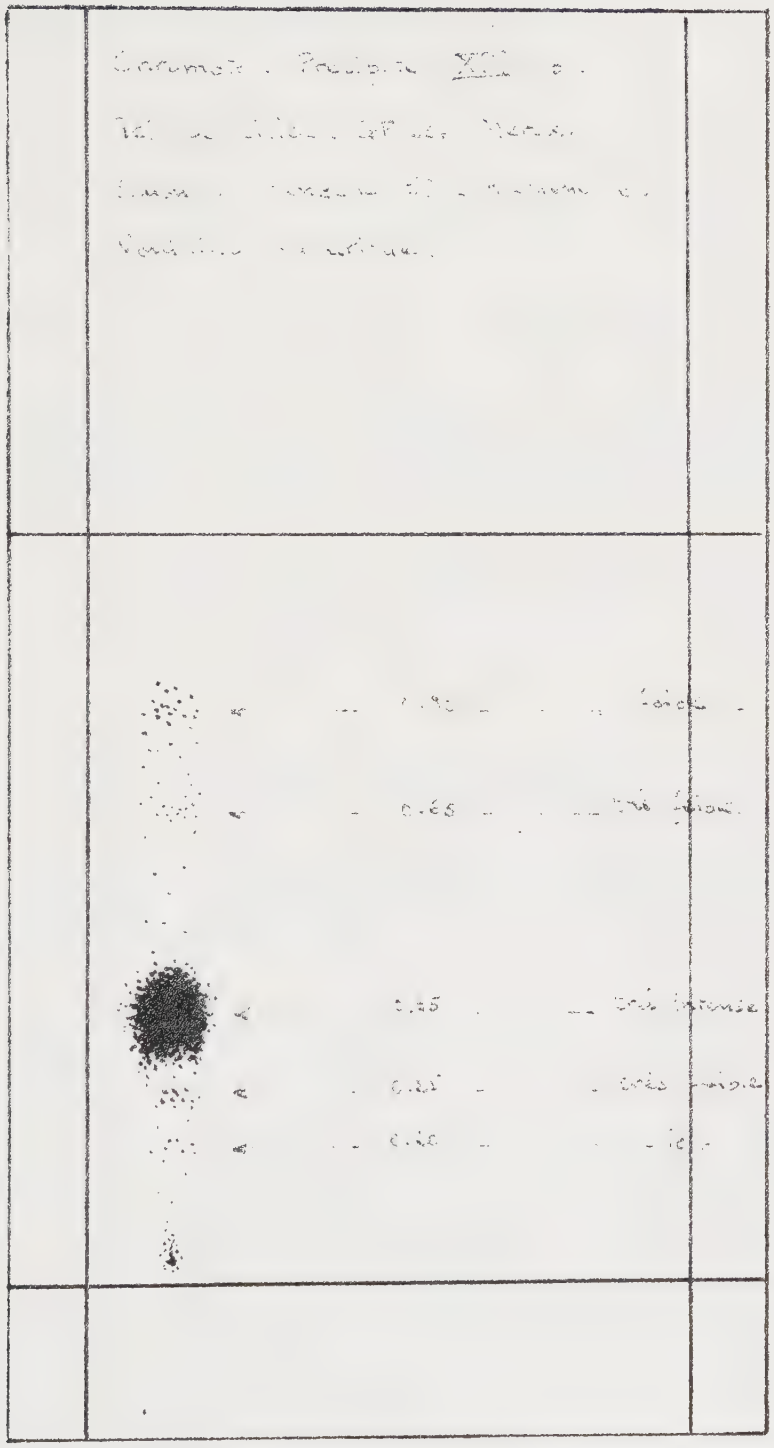
Le résidu XI est mis en solution dans le mélange benzène-éther de pétrole. Nous ajoutons goutte à goutte, une solution d'ammoniaque à 20 %, jusqu'à ce que la préparation ne précipite plus.

Nous filtrons alors le précipité obtenu. Nous obtenons :

A - un filtrat XIII

B - un précipité XIV

- Schéma 11 -



- A/ Le précipité XIV (schéma 9)

Le précipité est lavé à l'éther. Nous obtenons de nouveau deux fractions.

a) une fraction soluble dans l'éther sulfurique,

b) une fraction insoluble dans l'éther sulfurique.

a) Fraction soluble dans l'éther sulfurique :

Cette fraction, séchée sous pression réduite, nous conduit à un résidu jaune visqueux, dont le contrôle chromatographique nous a donné les renseignements suivants :

C C M : 1 spot très intense de Rf ~ 0,80-0,85
3 spots peu intenses de Rf ~ 0,20-0,35

b) Fraction insoluble dans l'éther sulfurique :

Après le lavage à l'éther, cette fraction est séchée, puis reprise par une solution méthanol-eau (80-20). On ajoute ensuite progressivement, une solution de HCl à 20 % jusqu'à pH = 7.

Le précipité obtenu est filtré, séché. Le contrôle chromatographique nous donne :

C C M : 1 spot intensité moyenne de Rf ~ 0,80
1 spot faible intensité de Rf ~ 0,65
1 spot intense de Rf ~ 0,35
1 spot peu intense de Rf ~ 0,20

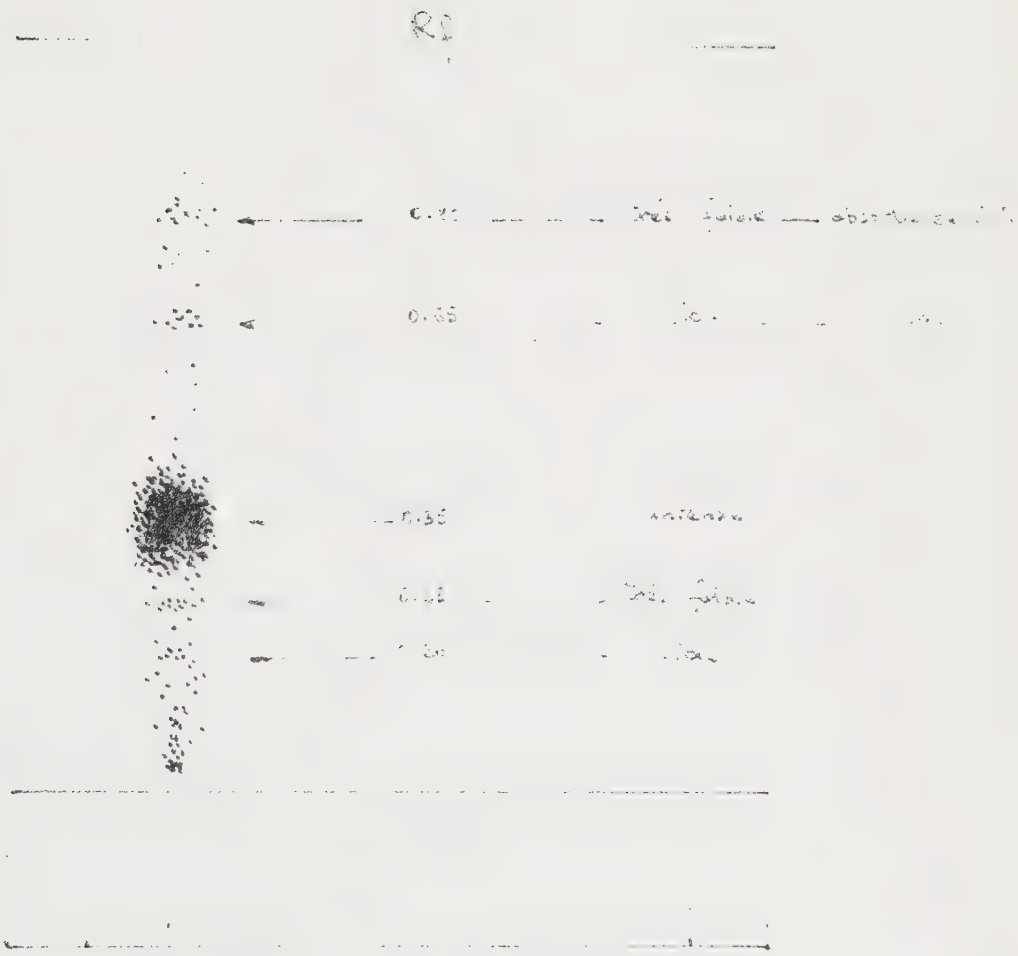
- Schéma 12 -

Chromato. Précipité XIII c.

Gel de silice. GF 254 Merck.

Eluant: benzène 50 - méthanol 6.

Vanilline sulfurique.



- B/ Le filtrat XIV -

On réalise sur ce filtrat, trois précipitations successives, en l'additionnant progressivement de quantités croissantes d'une solution d'HCl à 20%. En procédant soigneusement et en contrôlant les pH correspondants à des optima de précipitations, on obtient ainsi trois précipités distincts :

a) 1er précipité (XIV,a)

C C M : 1 spot intense de Rf 0,80-0,85
1 spot peu intense de Rf 0,65
1 spot très intense de Rf 0,32-0,35
2 spots peu intense de Rf 0,20-0,25

b) 2e précipité (XIV,b)

C C M : 1 spot peu intense de Rf 0,80-0,85
1 spot très peu intense de Rf 0,65
1 spot très intense de Rf 0,32-0,35
2 spots très faibles de Rf 0,20-0,25

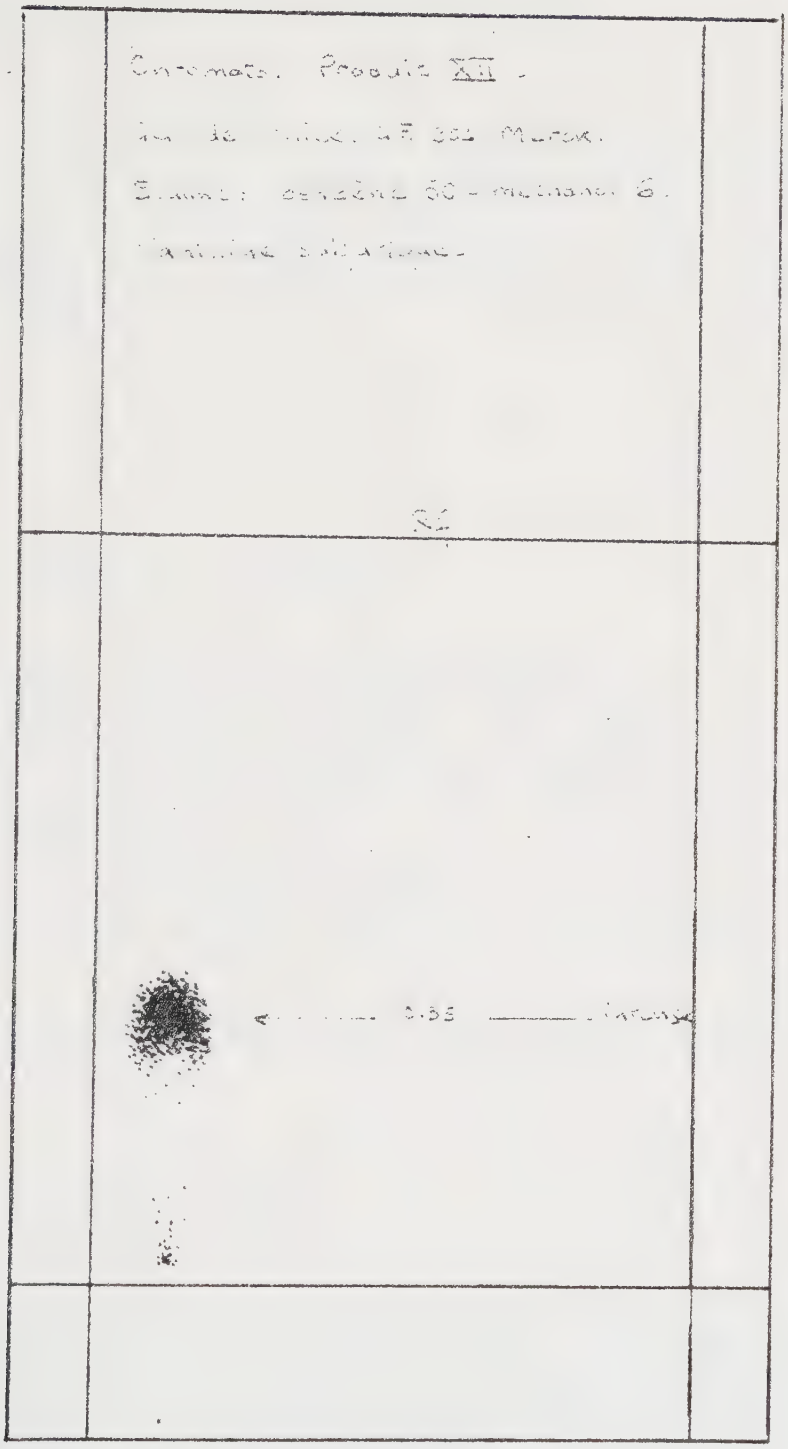
c) 3e précipité (XIV,c)

C C M : 1 spot très peu intense de Rf 0,80-0,85
1 spot très faible de Rf 0,65
1 spot intense de Rf 0,32-0,35
2 spots très faible de Rf 0,20-0,25

Nous nous sommes donc aperçus que de ces trois précipités, celui qui présentait le plus d'intérêt était celui qui possédait à la fois :

- un pourcentage suffisamment important de produit de Rf 0,32-0,35
- un pourcentage relativement faible de porduits de Rf différents et surtout de Rf 0,80-0,85.

- Schéma 13 -



Il est évident que le deuxième précipité (XIII,b) remplissait les deux conditions de façon satisfaisante.

Nous avons donc séché le deuxième précipité (XIII,b) et nous l'avons de nouveau lavé à l'éther.

Après un nouveau séchage, sous pression réduite, le précipité est repris à nouveau par le mélange benzène-éther de pétrole. Nous procédons alors à une nouvelle précipitation à l'aide de la solution ammoniacale à 20 %. Nous séchons, et après lavage de ce nouveau précipité à l'éther, le contrôle chromatographique de ce produit insoluble dans l'éther, nous a permis d'observer :

C C M : 1 spot intense de Rf ~ 0,32-0,35

- Caractéristiques de ce produit -

Insoluble dans l'eau, (forme acide)

Insoluble dans l'éther sulfurique,(forme sel d'NH_4^+)

Insoluble en milieu acide,

Soluble dans les solutions ammoniacales, sodiques et potassiques,

Blanc et cristallisé. (forme acide)

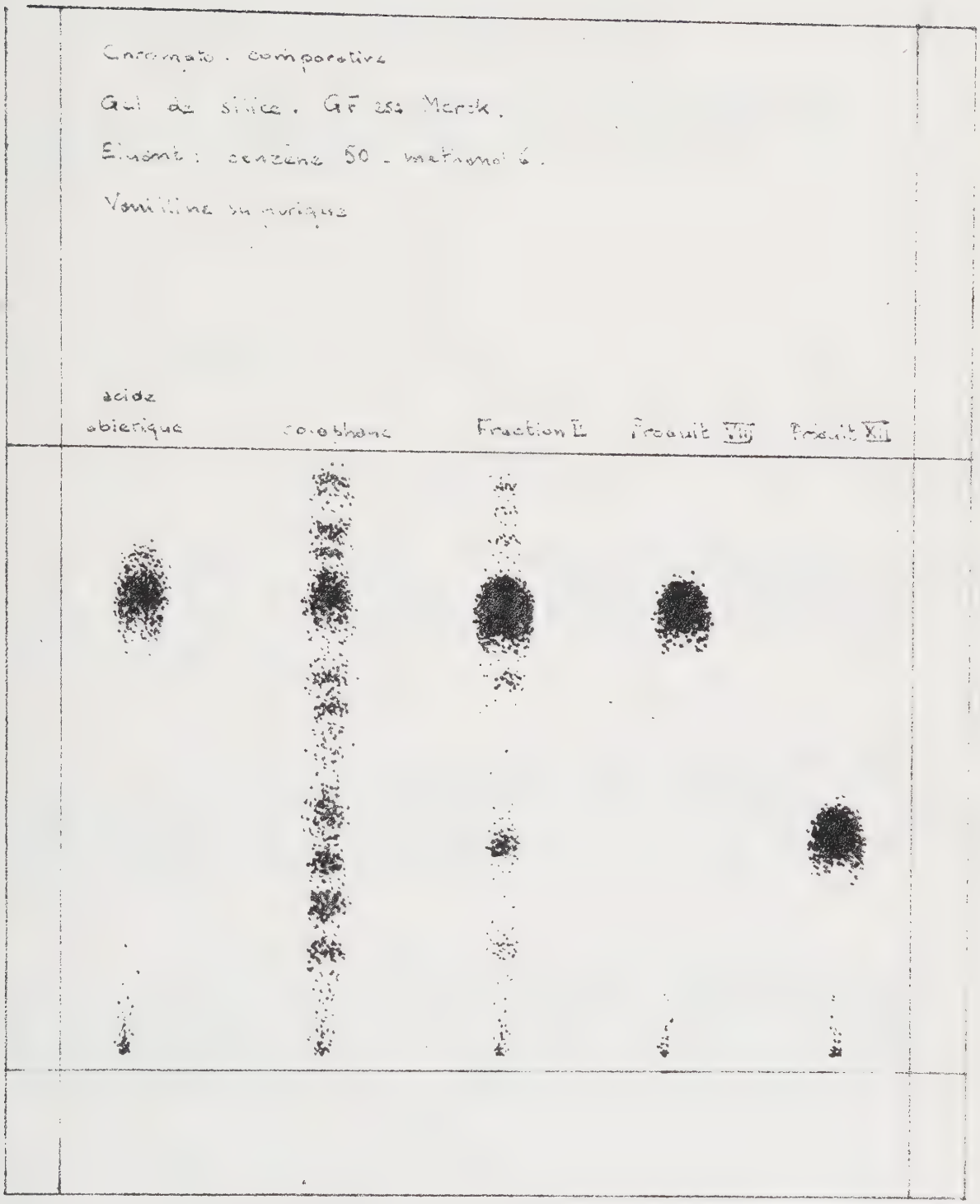
Soluble dans l'éther sulfurique (forme acide)

Ce produit est le même que le produit XII.

- Fractions I et IV -

Après leur avoir appliqué les contrôles chromatographiques utilisés pour les fractions II et III, ces fractions ne nous permettent pas d'observer de nouveaux spots. Qualitativement, la composition de ces fractions est la même que les fractions précédentes. Quantitativement, la masse de composés non cristallisables et difficiles à isoler est plus importante.

- Schéma 14 -


Chromato. comparative
Gel de silice. GF 254 Merck.
Eluant : benzène 50 - méthanol 6.
Vanilline sulfurique
acide abiétique
coréthane
Fraction E
Produit VII
Produit XII

Comme nous avons limité notre étude à l'isolement et à l'identification des corps correspondants aux spots de Rf ~ 0,80-0,82 et de Rf ~ 0,32-0,35, la purification des fractions I et IV ne présentait pas d'intérêt immédiat. Nous l'avons donc abandonnée pour le moment.

Il nous a été permis de constater ainsi que le produit XII pouvait être obtenu en utilisant deux modes d'extraction différentes.

3.- Identification -

Recherche d'identification directe des produits VIII et XII -

Avant d'employer les méthodes physiques de la spectrométrie et les tests analytiques classiques comme moyens d'investigation, nous avons tenté une dernière purification des produits à identifier par un entraînement à la vapeur en milieu basique (KOH).

Nous avons contrôlé que cette ultime précaution n'apportait aucun critère de pureté supplémentaire, les produits obtenus à la fin de cette opération étant strictement identiques à ceux du départ (contrôle chromatographique, analyse élémentaire, spectrométrie I.R et R.M.N).

De même, l'hydrogénation spécifique par Al Li H_4 du produit VIII, ne nous a pas conduit à l'obtention d'un produit nouveau. Cette hydrogénation étant caractéristique de la présence de produits cétoniques ou aldéhydiques, nous pouvions déjà douter de la présence de telles fonctions.

I/ Recherche d'identification du produit VIII -

a) Analyse élémentaire

Le produit VIII, sous forme d'échantillon solide broyé très finement, a été soumis à une méthode de micro-analyse. Les pourcentages des divers constituants se répartissent ainsi :

% C	=	75,17
% H	=	9,83
% O	=	15,00

On constate l'absence de tout autre élément, même à l'état de trace.

Le produit n'est pas hygroscopique.

b) Polarimétrie

Effectuée sur un Perkin Elmer 141 à lampe sodium (α 589), la mesure du pouvoir rotatoire du produit VIII en solution dans le chloroforme nous a conduit à des résultats essentiellement variables selon que les échantillons provenaient d'extraction différentes :

Produit VIII (α 589) = de + 42°33' à + 14°12'

(concentration utilisée : 10 mg/ml)

c) Spectrométrie U.V.

En solution dans l'hexane, le produit VIII présente un maximum d'absorption à 236 m μ.(Spectrophotomètre Cary 14).

L'absence d'absorption au-dessus de 250 mμ semble confirmer l'absence de groupements cétoniques ou aldéhydiques et de noyaux aromatiques.

L'absorption en U.V. dans cette région du spectre peut être dûe à la présence d'un système diénique ou de doubles liaisons exocycliques portées par des cycles saturés du type hexanique. Hypothèse qui semble renforcée par le fait que pour ce maximum (236 mμ), la densité optique mesurée est :

$$D_o = \log \frac{Io}{I} = 0,675$$

Le trajet optique des cuves étant de 1 Cm. et la concentration de 10 γ /ml (soit 1/32.000e de mole) ce qui nous donne un coefficient d'extinction moléculaire.

$$\varepsilon_{max} = 21.500$$

d) <u>Spectrométrie de masse</u> -

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre "AEI M 59", avec introduction directe du solide.

Les mesures de masses ont été effectuées avec une résolution supérieure à 1000 (vallée à 10 %), en utilisant l'hexafluorotributylamine comme pic de référence.

Pour le pic de référence, nous obtenons :

$$m/e = 26,98710$$

Une première mesure nous a conduit à envisager une masse approchée :

$$M \sim 302 - 303 \quad \text{(pic parent)}$$

Avec plus de précision, une mesure de masse effectuée sur le pic de base 293, nous donne le rapport :

$$R = 1,144856$$

Ce qui nous donne pour le produit VIII, une masse molaire :

$$M = 302,227215$$

e) Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

Les spectres obtenus, assez complexes, permettent cependant de repérer quelques massifs significatifs et d'éliminer un certain nombre de groupes fonctionnels, non compatibles avec leur résolution.

L'appareil utilisé est du type Varian (100 MHz).

Les mesures ont été faites sur le produit en solution dans le chloroforme ou dans le chloroforme deutérié.

Le zéro étant centré sur le pic du tétraméthylsilane.

A 11,4 ppm, nous observons la présence d'un proton acide (massif d'intégration 1), (Spectre n° 1).

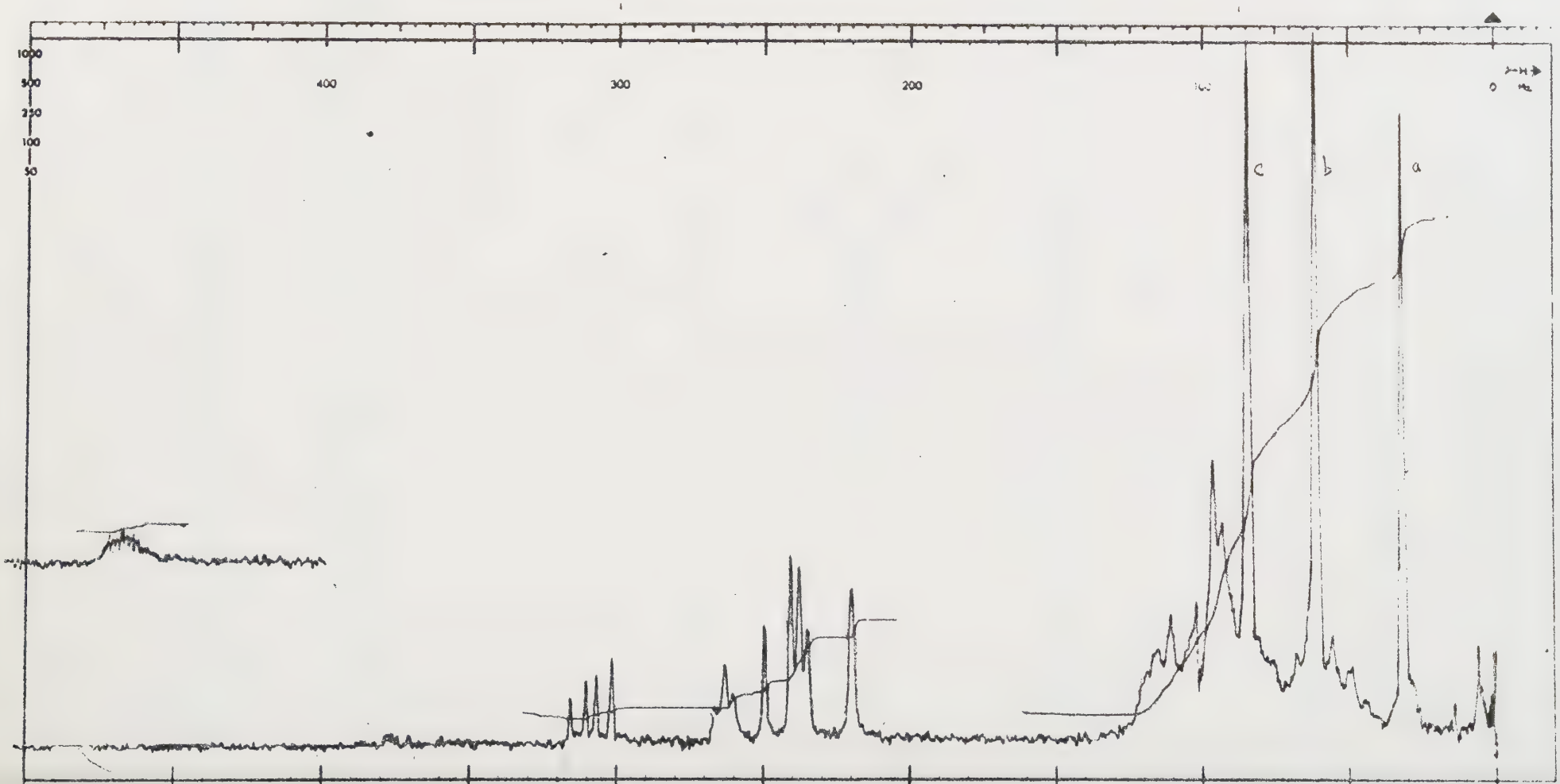
Ce massif disparait d'ailleurs lorsque l'enregistrement a lieu en milieu deutérié.

A 0,62 ppm, 1,22 ppm, 1,70 ppm, nous remarquons trois singulets (intégration 3) de glissements différents correspondant à trois groupements méthyl dont les différents voisinages , plus ou moins électronégatifs, provoquent des démasquages plus ou moins importants.

Ces singulets sont purs, non dédoublés, comme nous avons pu le constater sur les agrandissements. Nous

- Spectre n° 1 -

Produit VIII / Chloroforme $CHCl_3$



pouvons donc, à priori, éliminer la possibilité de présence de groupements fonctionnels isopropyle, n -propyle, isoamyle, néopentyle, etc ...

Entre 4,40 ppm et 6,35 ppm, nous observons différents massifs dont les figures semblent indiquer, par la nature de leurs déplacements et de leurs enchaînements, la présence de protons éthyléniques.

Ainsi les deux massifs suivants :

1°) massif situé entre 6,05 ppm et 6,31 ppm,

2°) massif centré sur 5,27 ppm

sont caractéristiques d'un groupement vinylique du type :

L'existence d'un couplage cis-trans entre les pics du massif situé entre 6,05 ppm et 6,31 ppm, avec

$$J_{cis} = 10 \text{ Hz}$$

$$J_{trans} = 18 \text{ Hz}$$

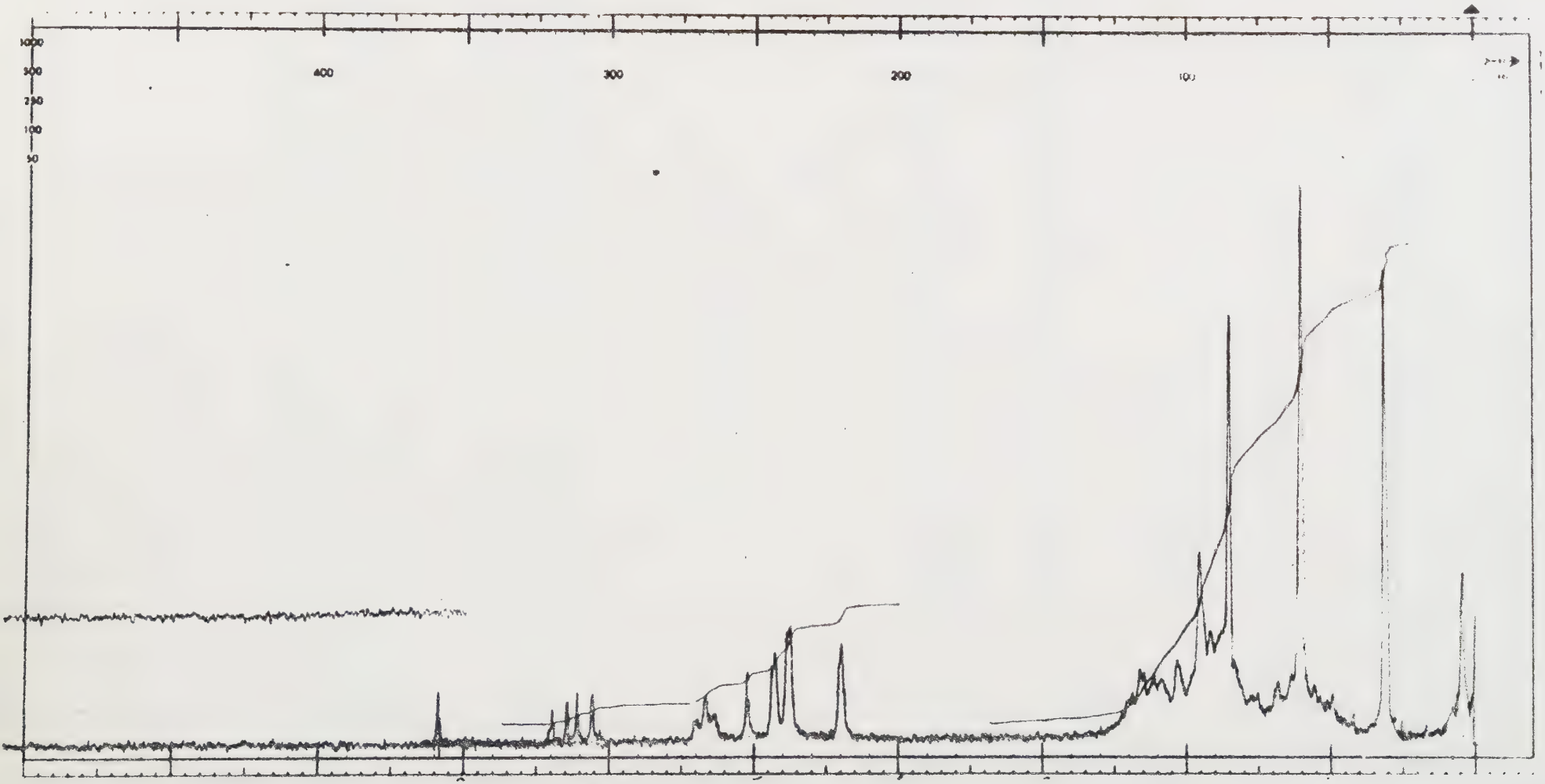
confirme d'ailleurs la présence d'un tel motif.

Le massif centré sur 4,75 ppm est d'une interprétation plus délicate.

Ce massif est formé de trois pics respectivement centrés sur 4,75 ppm, 4,69 ppm, 4,81 ppm.

- Spectre n° 2 -

Produit VIII / Chloroforme deutérié $CDCl_3$



Le pic centré sur 4,75 ppm disparait en milieu deutérié (Spectre n° 2) ce qui suggère la présence d'un proton alcoolique dans cette zone de glissement chimique. Le démasquage important pouvant être dû, par exemple, à la présence d'une double liaison en α de la fonction alcool rendant ce proton relativement acide.

Deux autres massifs centrés sur 4,4 ppm et 5 ppm laissent apparaitre sur les agrandissements, de très faibles constantes de couplage. Ce couplage et la situation des pics évoquent la possibilité de présence des deux protons géminés d'un groupement éthylénique du type méthylidène :

Enfin, les enchaînements -CH, $-CH_2$ sortent sous formes de massifs importants, complexes, non interprétables entre 1 et 2,5 ppm.

L'intégration générale nous donne trente deux protons qui peuvent se répartir ainsi en première approximation :

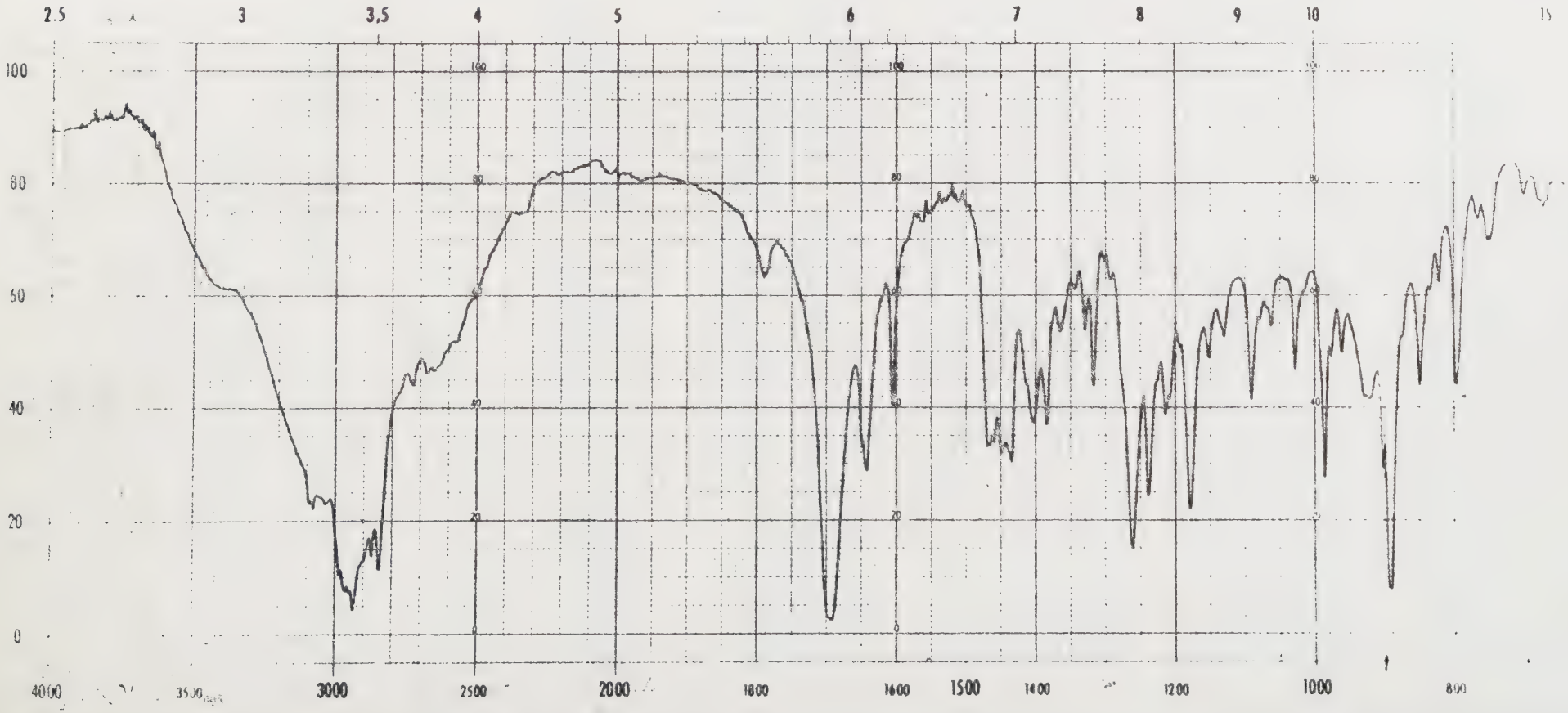
protons acides	:	1
protons alcooliques	:	1
protons éthyléniques	:	5
protons divers	:	25

Nous pouvons affirmer, en outre, l'absence de protons aromatiques, aldéhydiques, phénoliques, de groupements métoxy, éthoxy, acétyle, proprionyle.

- Spectre n° 3 -

Produit VIII / Phase solide

dilution KBr



f) Spectrométrie infra-rouge -

Les mesures ont été réalisées sur un appareil Perkin-Elmer, en phase solide (pastille KBr), à la dilution de 2mg/200 mg.

Le produit VIII possède une fonction acide que le spectre I.R. (spectre n° 3) nous a aidé à caractériser de la façon suivante :

- on trouve une bande large ν - OH centrée sur 2950 cm^{-1}.
- à la dilution P/5, P/10, P/100, on aperçoit (spectre n° 4), la bande ν - OH libres à 3525 cm^{-1}.

L'importance inhabituelle pour un acide de l'absorption au-dessus de 3.200 cm^{-1} nous permet de soupçonner la présence d'une fonction alcool, du type de celles rencontrées pour les fonctions hydroxyles liées entre 3.700 et 3.300 cm^{-1}. Cependant, en première approximation, cette bande large est difficile à attribuer précisemment.

L'étude en dilution (spectre n° 4) de la région de 1.800 cm^{-1} à 1.640 cm^{-1} fait apparaitre la vibration (c = o) de l'acide à 1.695 cm^{-1}, la coexistence possible d'un c = o d'ester, d'éther-oxyde, de lactone, de cétone ou d'aldéhyde est exclue par le fait qu'il n'existe qu'une bande c = o à 1.695 cm^{-1}, quelle que soit la dilution ou la méthode spectrométrique employée. Cela n'exclut pas évidemment la coexistence possible d'une fonction alcool.

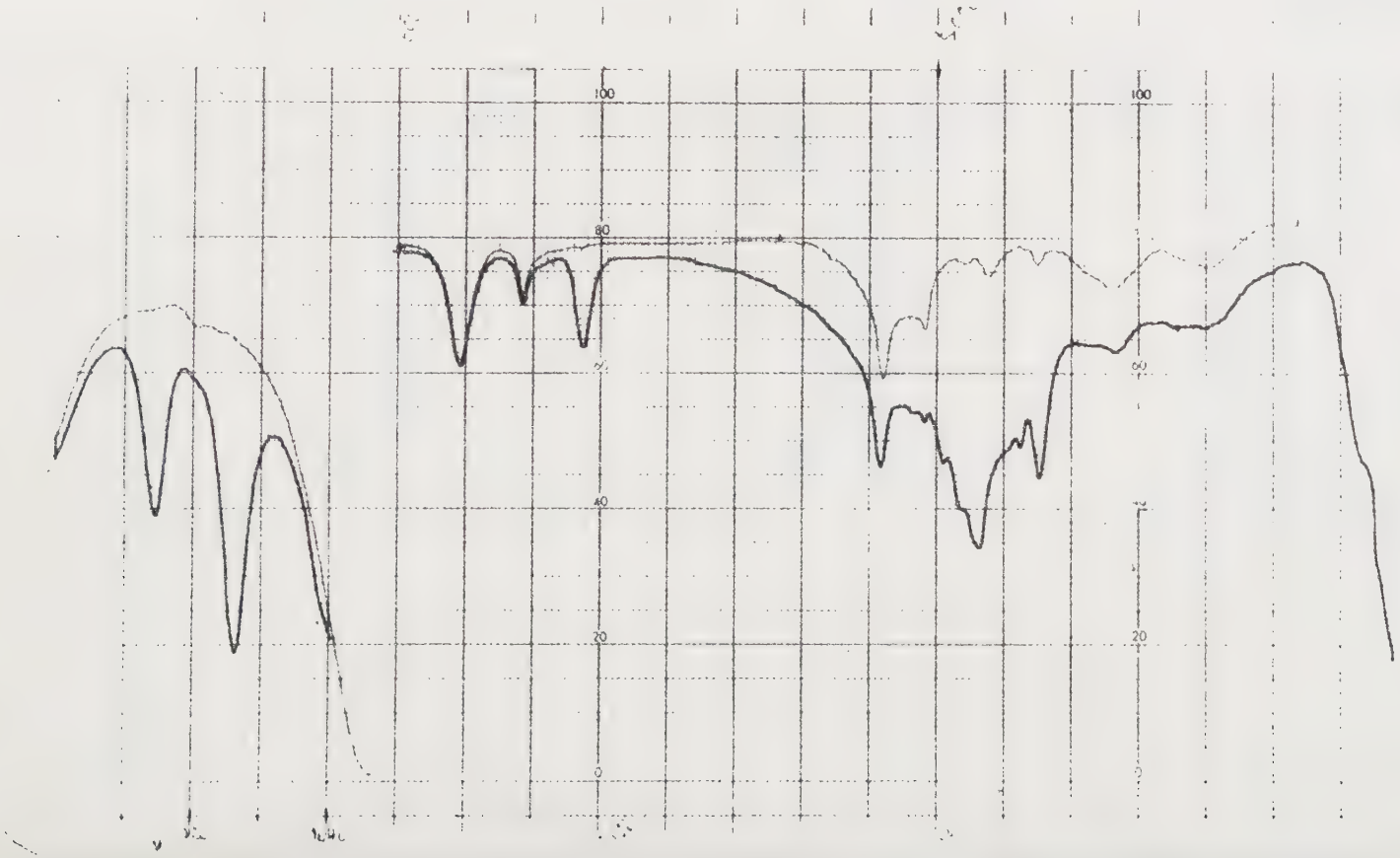
Notre hypothèse étant confirmée par ailleurs par l'absence des bandes caractéristiques d'éther-oxydes (1.050-1.175 cm^{-1}), d'époxydes (1.250 cm^{-1}) et d'anhydrides et par le fait que l'étude en dilution de la région du spectre située entre 3.700 et 2.700 cm^{-1} permet de discerner nettement une bande moyenne, aigue, compatible avec les bandes provoquées par l'existence des OH libres des alcools.

D'autre part, l'étude détaillée de la région du spectre située entre 1.690 cm^{-1} et 790 cm^{-1}, permet de se rentre compte de l'existence d'une grand nombre de bandes,

- Spectre n° 4 -

Etude en dilution du produit VIII

Phase solide / KBr



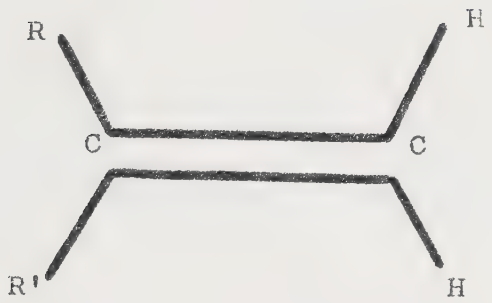
très difficiles à attribuer à priori, compatibles avec l'existence des motifs suivants :

1300-1290 cm^{-1} (v)

995-985 cm^{-1} (F)

1420-1410 cm^{-1} (F)
ν (c=c)

915-905 cm^{-1} (F)
γ (C-H)

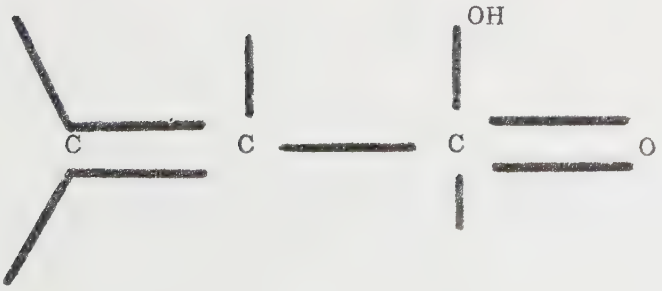


1420-1410 cm^{-1} (F)
ν (C=C)

895-885 cm^{-1}
γ (C-H)

1420-1410 cm^{-1}
ν (C=C)

840-790 cm^{-1}
γ (C-H)



1320 cm^{-1} (F)
δ (OH)

1690 cm^{-1} (F)
ν (C=O)

1440 cm^{-1} (f)
ν (C-O)

De même, la présence de deux bandes moyennes centrés sur 1.405 cm^{-1} et 1.375 cm^{-1} pourrait indiquer l'existence d'un groupement isopropyl, mais nous avons vu que l'étude des spectres R.M.N. provoquait l'abandon de cette hypothèse.

L'absence des bandes harmoniques dûes aux noyaux aromatiques renforce de même les résultats obtenus en R.M.N.

La complexité et le nombre des bandes qu'on pourrait attribuer aux groupements $- CH_3$, $- CH_2$, $- CH$, les rendent inutilisables.

g) Mesure du point de fusion -

Effectuée sur un appareil Büchi, la fusion du produit VIII n'est pas franche. Le produit commence à devenir déliquescent vers 95°C ; il subit ensuite une évolution lente jusque vers 110-112°C. Il conserve un aspect pâteux jusqu'à 115°C et fond brutalement vers 116°-118°C.

$$P_f = 116\text{-}118°C$$

h) Tests analytiques -

L'analyse élémentaire ayant confirmé la présence des seuls éléments C, O, H, ces tests analytiques classiques ont porté surtout sur la recherche des groupements fonctionnels carbonylés, hydroxylés et sur les insaturations liées au squelette hydrocarboné.

Recherche des doubles liaisons

- Action du brome -

Le produit VIII en solution dans le tétrachlorure de carbone anhydre donne une réaction positive en présence d'une solution de brome dans le tétrachlorure de carbone.

La décoloration est immédiate.

- Présence possible de doubles liaisons.

- Test de Bayer -

La décoloration du permanganate et le dépôt brun de MnO_2 indique :

- Présence possible de doubles liaisons.

Recherche de la fonction acide

Le caractère acide du produit VIII est confirmé par les tests suivants dans le mélange acétone-eau.

- Produit VIII soluble dans la potasse (pas de différence avec les phénols).

- Soluble dans le carbonate de soude et le bicarbonate de soude (différence avec les phénols). Le dégagement de CO_2 trouble l'eau de chaux.

Recherche des fonctions aldéhydes et cétones

Le produit VIII ne donne pas plus de réaction positive avec la 2-4 dinitrophénylhydrazine, qu'avec la semi-carbazide. Ce qui exclu la possibilité de présence des fonctions aldéhydes ou cétones. Le résultat est d'ailleurs compatible avec ceux obtenus à partir de l'étude des spectres R.M.N. et I.R.

Les tests à la liqueur de Fehling et au réactif de Schiff sont aussi négatifs.

Recherche des esters et lactones

Le test à l'hydroxamate ferrique, en milieu méthanolique alcalin, ne permet pas de voir apparaître

la coloration rouge bleuâtre caractéristique de ces fonctions. Le test est donc négatif, comme il est très spécifique en l'absence d'amide, et c'est le cas, il permet en accord avec l'étude R.M.N. et I.R. de conclure à l'absence de ces fonctions.

Recherche des phénols -

La copulation sur le diazoïque de la paranitriline en milieu alcalin, n'a pas donné de résultat interprétable. On ne peut infirmer ou confirmer la présence du dérivé quinoïde rouge, la coloration indéfinissable du milieu étant très dense.

La réaction de Liebermann (Cheronis 272) donne un résultat franchement négatif.

Recherche de la fonction alcool -

Après avoir saturé les doubles liaisons (méthode de bromation) pour éviter l'ambiguité dûe à la déshydratation des molécules porteuses d'une fonction alcool, nous avons utilisé une batterie de tests spécifiques.

- Test à l'oxinate de vanadium -

Le réactif, très sensible, a été obtenu de la façon suivante :

Nous avons mélangé 1 cm^3 d'une solution légèrement alcaline d'anhydride vanadique (V_2O_5) à un volume égal d'une solution acétique d'oxine. Le précipité noir obtenu a été extrait par 1 cm^3 de benzène.

En chauffant, pendant quelques minutes, dans un bain-marie à 60°C, une goutte d'une solution benzénique du produit VIII et cinq gouttes du réactif, nous avons constaté la formation d'un complexe de solvatation rouge, assez caractéristique de la présence d'un OH.

- Test de formation de xanthogénates (Cheronis 252)

Nous avons ajouté une pastille de KOH à 1cm^3 d'une solution saturéede produit VIII dans l'éther sulfurique. Après avoir refroidi, nous avons ajouté, goutte à goutte, du CS_2. Le précipité obtenu, brunâtre, ne nous a pas convaincu sur ce test, de la présence possible d'un OH.

- Test à la N - bromosuccinimide -

Nous avons dissous 60 mg de produit VIII dans 2 cm^3 d'une solution à 0,01 % de brome dans CCl_4.

Après avoir ajouté 30 mg de N - bromosuccinimide, nous avons placé le tube réactionnel dans un bain à 80°C où nous avons maintenu le mélange en douce ébullition pendant 15 mn.

Nous n'avons pas observé de modification de couleur. Ce test pourrait plaider en faveur de la possibilité de présence du OH d'un alcool tertiaire, si la présence certaine d'une fonction alcool était confirmée par ailleurs.

- Test au réactif de Denigès -

Ce réactif est élaboré de la manière suivante :

HgO	50 g
SO_4H_2	200 cm^3
H_2O	1000

Nous avons porté à ébullition 2 cm^3 de ce réactif. Une goutte de produit VIII, en solution saturée dans CCl_4, ajoutée à ce réactif bouillant, a permis la formation instantanée d'une précipité jaune, floconneux, très abondant.

- Présence possible d'une fonction alcool tertiaire.

Remarque -

La complexité vraisemblable de la molécule envisagée pour le produit VIII, ne permet pas une approche directe de la chaîne hydrocarbonnée par les tests analytiques classiques. Cette étude sera décrite ultérieurement dans les paragraphes consacrés à l'étude comparative du composé étudié.

II/ Recherche d'identification du produit XII -

Par souci de reproductibilité et de comparabilité des résultats, cette recherche a été effectuée avec les mêmes appareils et les mêmes méthodes que pour le produit VIII.

a) Analyse élémentaire

Comme pour le produit VIII, nous avons effectué la microanalyse du produit XII sur un échantillon de composé finement broyé.

Le pourcentage moyen des constituants est le suivant :

% C = 75,20
% H = 9,87
% O = 14,93

On constate une coïncidence avec les résultats obtenus par l'analyse du produit VIII.

Pas de trace d'autres éléments.

Produit non hygroscopique.

b) Polarimétrie

La mesure du pouvoir rotatoire du produit XII sur des échantillons provenant d'extraction diverses, mis

en solution dans du chloroforme, nous a permis de noter les résultats suivants :

Produit XII : α_{589} = + 1°5' à + 3°30'

à la concentration de 10 mg/ml.

c) Spectrométrie U.V.

Le produit XII, en solution dans l'hexane, ne semble pas avoir d'absorption notable en U.V., principalement pour les longueurs d'onde supérieures à 200 mμ. Ce qui permet d'envisager l'absence de systèmes conjugués ou diéniques, aldéhydiques, cétoniques, aromatiques, etc ....

La concentration utilisée était de 10 γ/ml (1/32.000e de mole).

d) Spectrométrie de masse

Les spectres de masse obtenus pour le produit XII sont exactement semblables à ceux que nous avions obtenus pour le produit VIII.

La masse molaire est évidemment la même :

M = 302, 22745

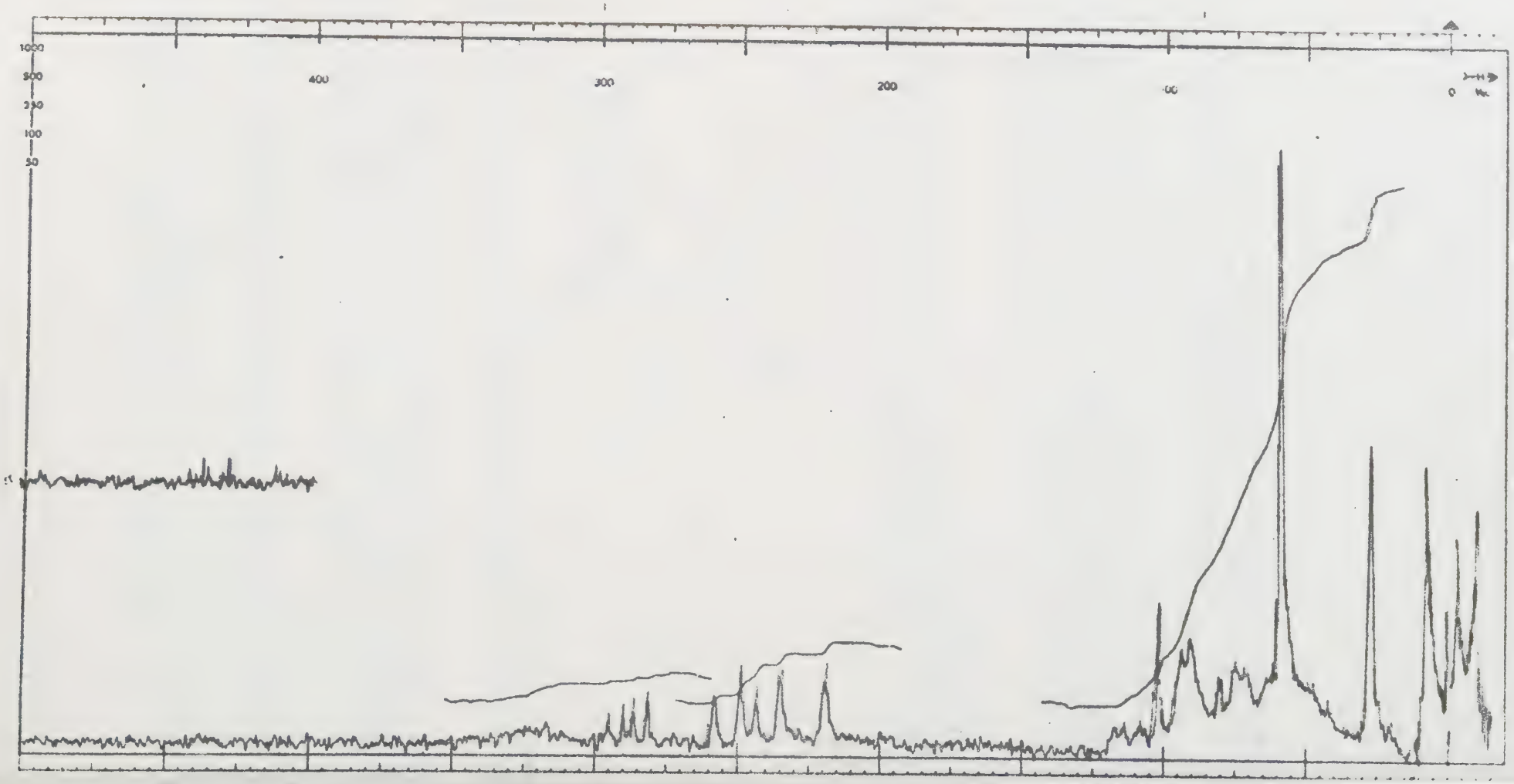
Pour les deux produits, l'étude détaillée des spectres ne nous a pas été d'un grand secours, les pics étant trop nombreux et non caractéristiques. D'autre part, ce moyen d'investigation ne nous a pas permis de situer les différences entre les deux molécules. Le seul renseignement qui a pu être retenu est qu'il s'agit vraisemblablement de deux isomères de chaîne.

e) Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

Dans ce cas aussi, les spectres obtenus sont complexes et difficilesà interpréter (spectre n° 5).

- Spectre n° 5 -

Produit XII / Chloroforme

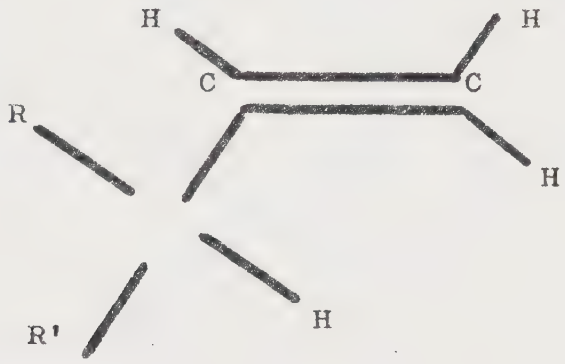


Cependant, nous pouvons, grâce à ce moyen d'investigation, profiter de quelques renseignements nouveaux.

Nous constatons tout d'abord que le proton acide n'est pas nettement caractérisé par l'appareil. Nous ne pouvons pas, derechef, conclure à l'absence de fonction acide.

En effet, les spectres de l'acide abiétique et de quelques uns des composés acides de la même famille laissent apparaître la même lacune, bien qu'ultérieurement d'autres tests aient démontré le caractère acide de ces composés.

Entre 5.60 ppm et 5.90 ppm, puis à 4,85 ppm, nous notons un ensemble de massifs caractéristiques d'un motif tel que :



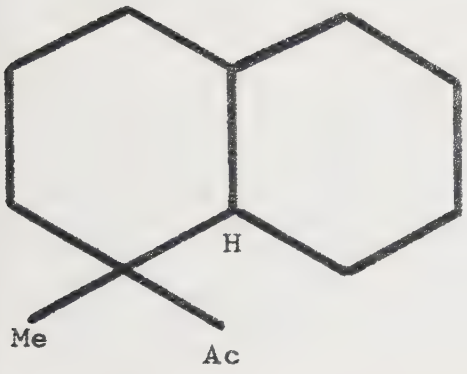
En outre, le spectre deutérié du produit XII indique la disparition du pic centré sur 4,70 ppm, ce qui nous permet de conclure à sa représentativité éventuelle d'un proton alcoolique.

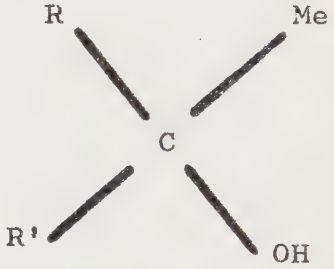
Enfin, nous avons minutieusement étudié la région des spectres comprise entre 2 ppm et 0,55 ppm. Nous avons pu avancer quelques hypothèses, mais il ne nous a pas été possible d'être catégoriques dans les conclusions de notre analyse. En effet, si nous pouvons attribuer le groupement méthyl qui sort sous forme d'un singulet d'intégration 3 à 0,55 ppm.

Le singulet d'intégration 6 qui sort à 1,18 ppm est plus difficile à identifier. Sur toutes les molécules spectrées présentant le motif suivant :

nous avons pu nous rendre compte que les deux méthyl avaient des glissements chimiques différents, à peu de chose près il est vrai.

Le motif isopropyl est à écarter, le singulet étant d'un tracé pur malgré l'agrandissement. On ne remarque sur celui-ci qu'un léger épaulement, comme pour la superposition presque totale de deux pics. Or, après avoir examiné de nombreux spectres de composés très voisins, nous avons pu en tirer la tendance suivante :





Quel que soit le reste de la molécule, les composés possédant les motifs structuraux ci-dessus font tous apparaître un singulet d'intégration 3 dans la région du spectre située entre 1,15 et 1,28 ppm. Bien qu'il s'agisse de pure coïncidence, il nous a paru vraisemblable d'avoir observé sur les spectres, une superposition de deux de ces motifs.

Les enchaînements - CH, - CH_2, ne sont pas interprétables et sortent sous forme de massifs importants entre 1 et 2,5 ppm.

L'intégration générale nous donne trente deux protons qui peuvent se répartir ainsi :

protons acides	:	1	?
protons alcooliques	:	1	
protons éthyléniques	:	3	
protons divers	:	27	

Absence de protons aromatiques, phénoliques, etc .

f) Spectrométrie infra-rouge

Comme le produit VIII, le produit XII possède une fonction acide que le spectre I.R. (spectre n° 6) met en évidence.

On trouve une bande large ν - OH centrée sur 2.950 cm^{-1} et à la dilution P/5, P/10, P/100, on aperçoit la bande ν - OH libres à 3.525 cm^{-1}.

Le ν (C = O) sort lui à 1.695 cm^{-1}. Nous avons donc à faire à une fonction acide du même type que celle du produit VIII.

Si les nombreuses bandes signalées pour désigner les motifs insaturés dans l'étude des spectres I.R. du produit VIII existent toujours pour la plupart, nous apercevons cependant des différences. Soit par l'absence de bandes existant pour le produit VIII, par exemple à 1.780 cm^{-1}, 1.600 cm^{-1}, 1090 cm^{-1}, 890 cm^{-1}, soit par une différence nette d'intensité, par exemple à 1.300 cm^{-1}, 1.260 cm^{-1}, 900 cm^{-1}. Soit par la présence de nouvelles bandes, par exemple à 2.300 cm^{-1}, 1.500 cm^{-1}, 915 cm^{-1} et 875 cm^{-1}.

L'allure générale des spectres I.R. du produit XII est d'ailleurs très proche de celle des spectres du produit VIII.

Ainsi, les bandes caractéristiques de fonction autres que les fonctions acide, alcool et doubles liaisons sont absentes.

On note dans la région vers 3.400 cm^{-1}, une absorption plus importante, dûe vraisemblablement à des - OH alcooliques de caractéristiques sensiblement différentes de deux du produit XII.

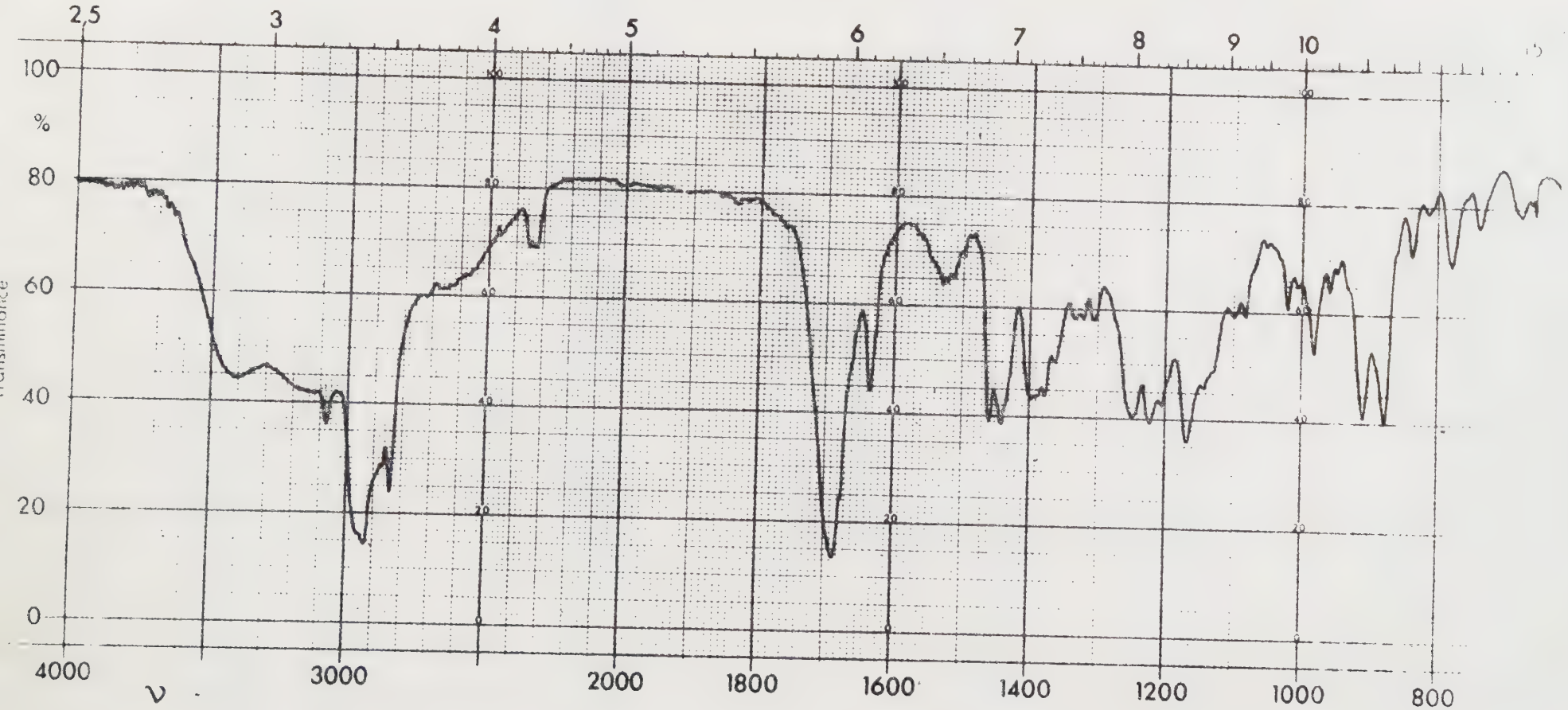
L'apparition de deux bandes nouvelles à 3.090 cm^{-1} et 2.300 cm^{-1}.

g) Mesure du point de fusion

La mesure du point de fusion toujours au moyen de l'appareil Büchi, nous a permis d'enregistrer des résultats très différents de ceux obtenus avec le produit VIII.

- Spectre n° 6 -

Produit XII / phase solide
dilution KBr



La fusion plus franche se situe à une température nettement plus basse et le temps durant lequel le produit devient déliquescent se trouve passablement écourté.

Le produit VIII commence à changer d'aspect vers 67°C, devient déliquescent jusqu'à 69°C, puis fond franchement à 71°C.

e) Tests analytiques

Toujours avec le même souci de pouvoir comparer les résultats obtenus pour les deux produits, la batterie de tests, utilisés pour le produit VIII, a été employée pour le produit XII dans les mêmes conditions opératoires.

Recherche des doubles liaisons

- Action du brome -

Le test a été, ici aussi, positif.

Présence possible de doubles liaisons.

Cependant, la décoloration a été plus lente et moins nette que pour le produit VIII.

- Test de Bayer -

Même remarque pour ce test, la réaction est moins franche, le dépôt de MnO_2 très faible.

Présence possible de doubles liaisons.

Recherche de la fonction acide

Les résultats obtenus sont absolument identiques à ceux enregistrés avec le produit VIII.

- Solubilité dans KOH
- Solubilité dans CO_3Na_2 et CO_3HNa (dégagement de CO_2)

Recherche des fonctions aldéhydes et cétones

Tous les tests sont négatifs comme pour le produit VIII. Le produit XII ne donne pas plus de réaction avec la 2 - 4 dinitrophénylhydrazine, qu'avec la semi-carbazide, la liqueur de Fehling ou le réactif de Schiff.

Ici aussi, les résultats sont compatibles avec l'étude des spectres I.R. et R.M.N.

Recherche des esters et lactones

Là aussi, le test à l'hydroxamate ferrique s'est révélé négatif, permettant d'éliminer l'éventuelle existence de ces fonctions, toujours en accord avec les résultats de l'étude spectrographique.

Recherche des phénols

Les deux tests, non interprétables, ne nous ont pas permis de tirer de renseignements utiles de ces manipulations.

Recherche de la fonction alcool

Le produit XII traité comme le produit VIII par une bromation a été soumis à la batterie de tests mise en place pour le produit VIII.

- Test à l'oxinate de vanadium -

Ce test a été positif. Le complexe de solvatation rouge s'est formé aussi rapidement et nettement que pour le produit VIII. La possibilité de présence d'un OH fonctionnel sur la molécule du produit XII se précise.

- Test de formation de xanthogénates -

Ce test a été complètement négatif et la réaction n'a pas eu lieu du tout. Nous n'avons même pas obtenu le précipité brunâtre qui s'était formé avec le produit VIII.

- Test à la N - bromosuccinimide -

Pour ce test aussi, comme pour le produit VIII, nous n'avons pas observé de changement de couleur, ce qui peut indiquer que nous sommes en présence d'un alcool tertiaire, si la présence d'un OH alcoolique est confirmée par ailleurs.

- Test au réactif de Denigès -

Le précipité jaune obtenu est moins abondant que pour le produit VIII. Le test est malgré tout positif et la présence d'une fonction alcool tertiaire pour le produit XII semble se confirmer.

Remarque -

Comme pour le produit VIII, il ne nous a pas été possible d'utiliser cette batterie de tests à l'étude du squelette hydrocarboné. D'une façon générale, l'ensemble des tests, bien qu'indiquant la présence possible de doubles liaisons et de OH alcooliques tertiaires, n'ont pas été aussi nets que pour le produit VIII.

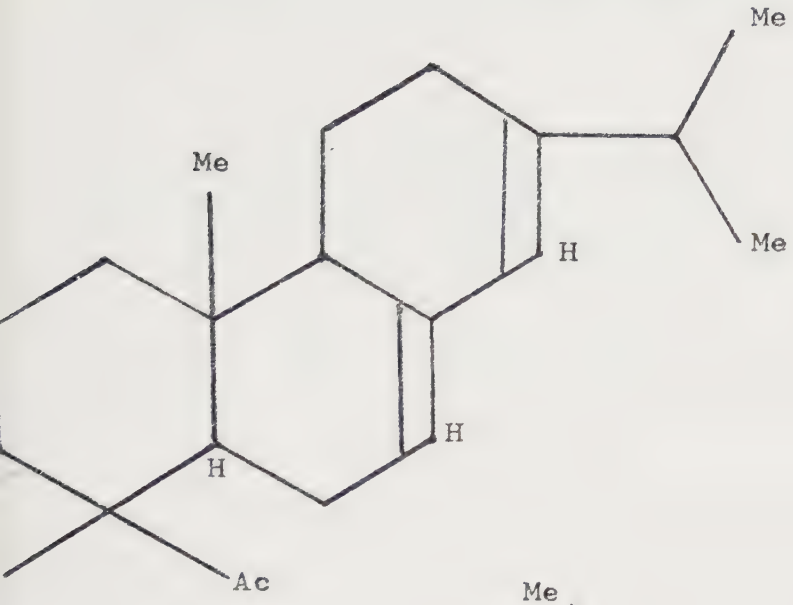
Recherche d'identification comparative des produits VIII et XII

I.- Etude générale prospective -

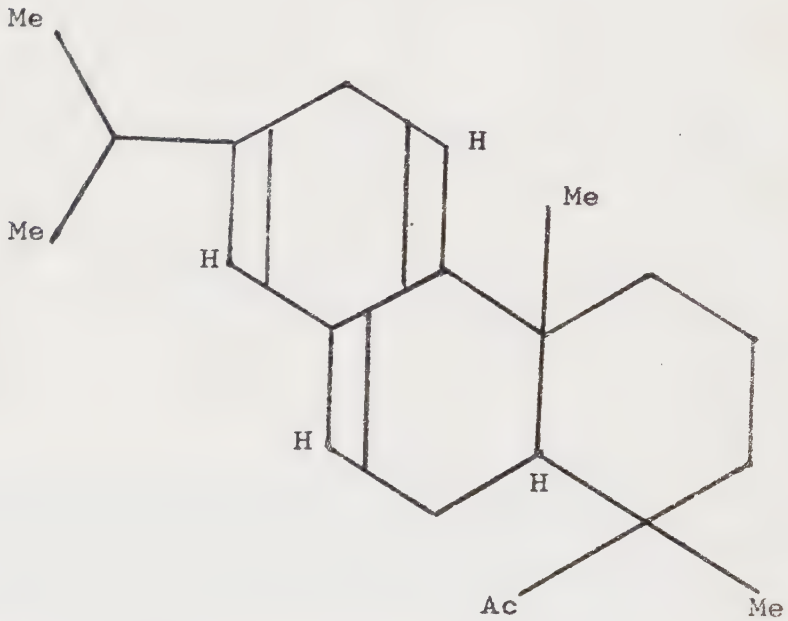
Les travaux effectués sur la composition de fractions non volatiles ou résineuses d'un certain nombre de conifères (pins, sapins) et sur le cyprés, ont montré la présence fréquente d'isomères de type mono-, sesqui-, di-, tri-terpénique, porteurs de groupements fonctionnels acides ou alcooliques.

- Planche III -

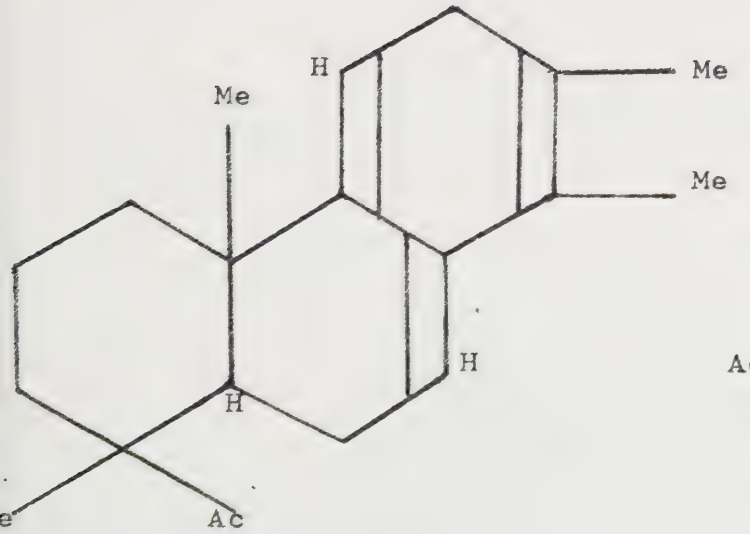
PODOCARPACEAE



Acide abiétique
$C_{20}H_{30}O_2$



Acide déhydroabiétique
$C_{20}H_{28}O_2$



Acide déhydroisopropylabiétique
$C_{17}H_{21}O_2$

Nous avons rassemblé sur des planches hors-texte les formules développées des principaux produits connus.(Planches n° III à XI).

Les différents auteurs n'étant pas en accord sur la nomenclature à employer d'une part, la complexité des nomenclatures normalisées rendant leur emploi mal aisé dans le texte d'autre part, il nous a semblé pratique d'utiliser le nom usuel ou vernaculaire de ces produits.

Voici quelques exemples pour justifier notre initiative :

Acide abiétique :

Podocarpa, 7, 13, diène-15, oïc-13, isopropyl

Acide déhydroabiétique :

Podocarpa 8, 11, 13, triène-15, oïc-13, isopropyl

Acide copalique :

5 , 9 H, 10 -Labda 8 (20), 13-diène, 15-oïc

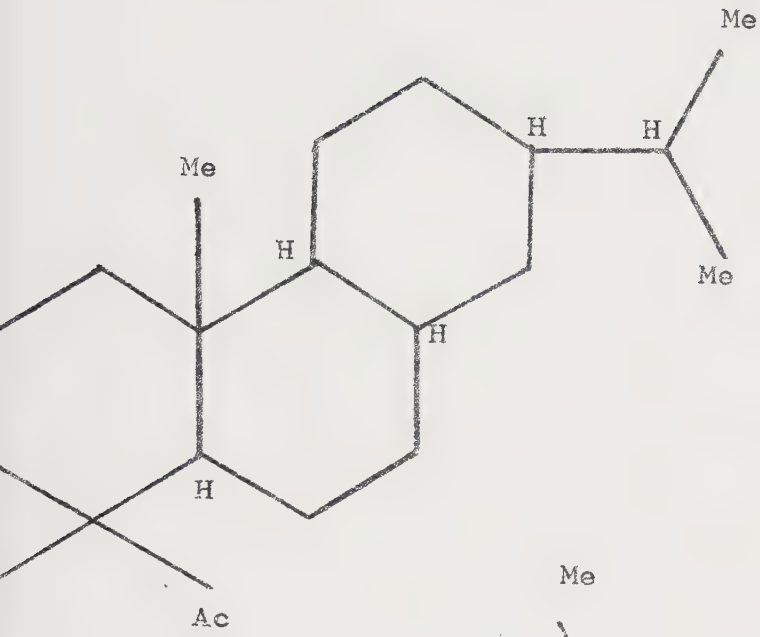
Pour pouvoir nous livrer à une étude comparative par rapport à ces molécules déjà identifiées, nous avons relevé systématiquement les résultats obtenus par les auteurs qui ont étudié ces produits d'extraction et nous avons noté, à ce propos, quelques conclusions relevées dans la littérature.

Utilisant une méthode de saponification, P. KAJAUNE et E. HONKANEN (15) ont pu déterminer la composition d'une colophane :

acide	abiétique	42 %	
"	néoabiétique	1 %	
"	déhydroabiétique	25 %	73 %
"	dihydroabiétique	5 %	
"	dextroprimarique	19 %	27 %
"	tétrahydropimarique .	8 %	

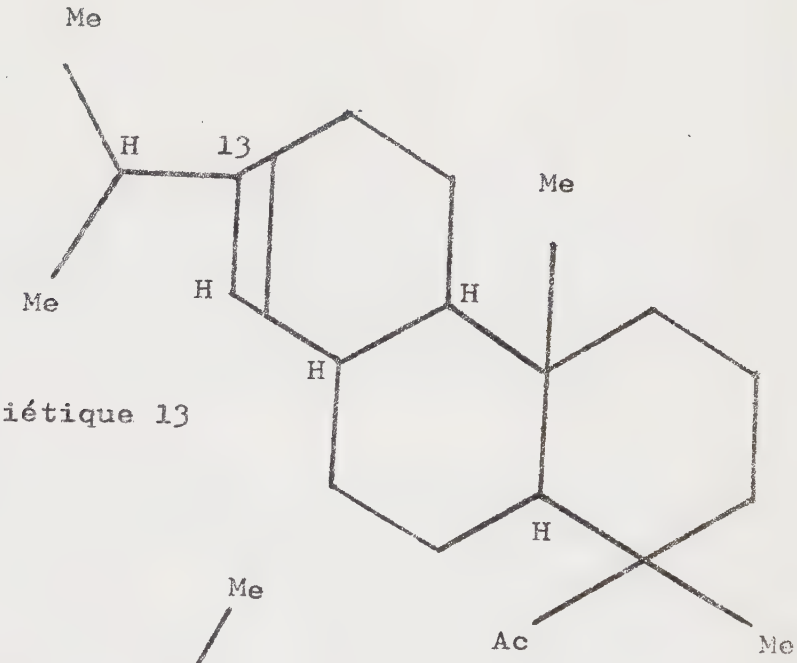
- Planche IV -

Podocarpaceae



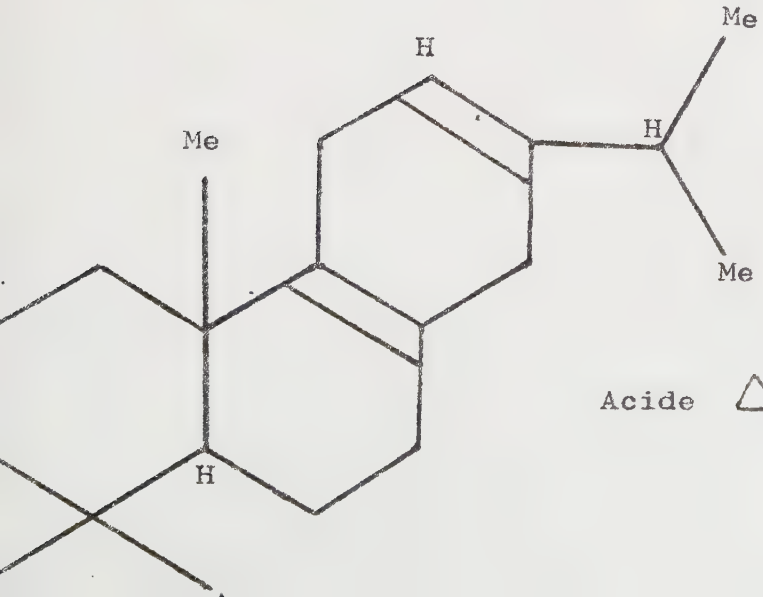
Acide tétrahydroabiétiqu

$C_{20}H_{34}O_2$



Acide dihydroabiétique 13

$C_{20}H_{32}O_2$



Acide $\Delta^{8,12}$ abiétadiénoïque

$C_{20}H_{30}O_2$

La partie insaponifiable varie de 7,5 à 10,5 % par rapport à la fraction résineuse de départ et suivant l'origine de la résine.

R. RIFFER (22) s'est intéressé, plus spécialement, aux résines de pin Excelsea et donne les pourcentages suivants pour les produits acides non volatils entrant dans la composition :

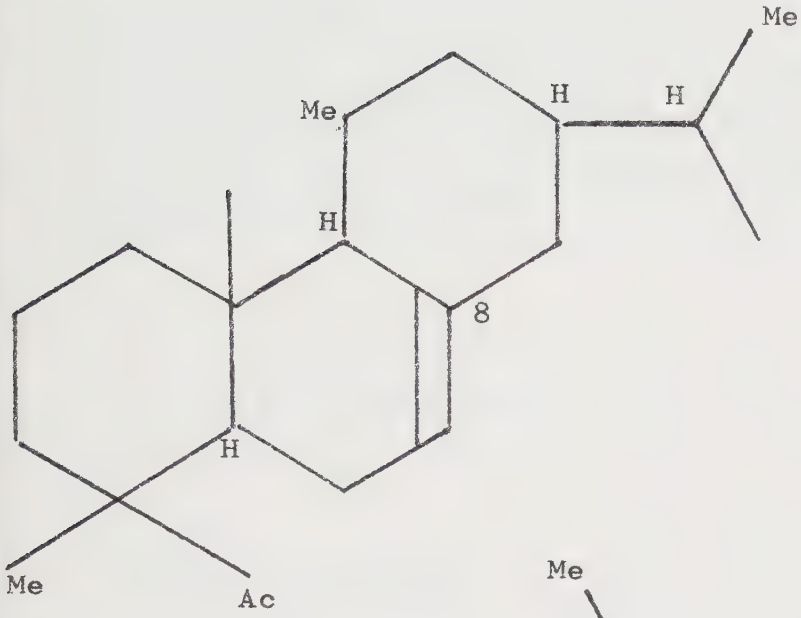
acide	abiétique	35 %	
"	déhydroabiétique	12 %	
"	néoabiétique	7,5 %	58 %
"	tétrahydroabiétique	3,5 %	
"	pimarique	16,5 %	
"	lévopimarique	13 %	
"	isopimarique	7,5 %	42 %
"	tétrahydroabiétique	5 %	

Par ailleurs, F.A. MEDNIKOV (20) partant de fractions acides non volatiles extraites de différentes espèces de conifères a eu l'idée de provoquer l'isomérisation des acides palustriques et lévopimariques, en traitant la partie saponifiable des résines par une solution 0,5 N d'acide chlorhydrique à 100°C sous CO_2. Les résultats obtenus par cette méthode sont les suivants :

Rendement en acide abiétique	Partie végétale traitée
57 %	bois de pin (souche)
41 %	bois de sapin (souche)
34 %	résine de pin (branche) résine de sapin (branche)
23 %	fruit de sapin
34,1 %	fruit de pin

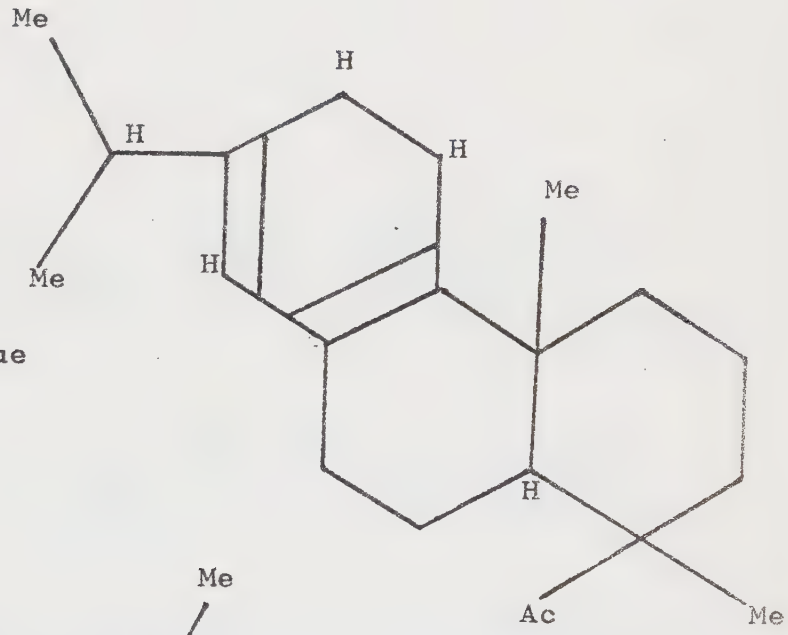
- Planche IV -

Podocarpaceae



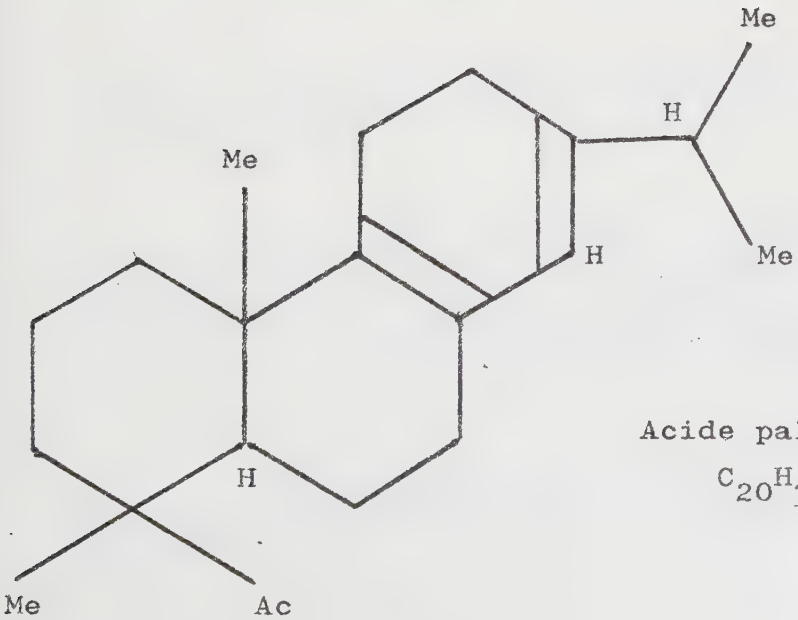
Acide dihydroabiétique 8

$C_{20}H_{32}O_2$



Acide déhydroabiétique

$C_{20}H_{32}O_2$



Acide palustrique

$C_{20}H_{30}O_2$

Nous avons déjà vu les travaux de R. RIFFER sur les résines brutes de Pin Excelsea, I. I. BARDYSHEV et Kh. A. CHERCHES (3) ont traité ces résines brutes par une solution aqueuse de soude. Ils ont repris ensuite la partie soluble par un mélange d'acide borique et d'anhydride maléïque séparant ainsi les acides déhydroabiétiques et palustriques de la fraction acide non volatile. Les deux produits isolés par cette méthode sont caractérisés par leur pouvoir rotatoire et leur point de fusion :

acide déhydroabiétique	$P_f = 170 - 171°C$ $\alpha_D = 61°5'$
acide palustrique	$P_f = 163 - 164°C$ $\alpha_D = 70°6'$

Par cette méthode, le rendement quantitatif de ces deux acides, par rapport aux autres composants de la fraction acide non volatile, est tel que ces auteurs en concluent que ces deux produits sont les composants principaux de ce type de résine.

Or, ce résultat est en désaccord avec celui de R. RIFFER pour qui les deux composants principaux étaient les acides abiétique et pimarique et qui ne mentionnait même pas l'existence d'acide palustrique.

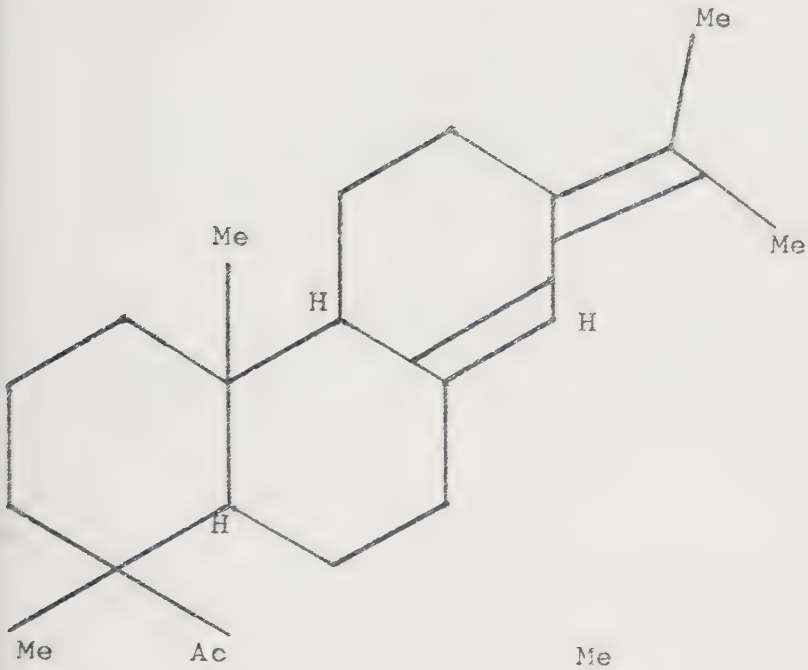
Nous nous sommes rendu compte que ces bilans étaient difficilement comparables et aléatoires, quantitativement et qualitativement.

Le nombre de facteurs intervenant étant trop grand pour que ces résultats soient considérés dans l'absolu : origine, espèce végétale, conditions climatiques, nature du terrain, date de la récolte, dégradation enzymatique ou oxydative au stockage, méthode d'extraction, forme allotropique etc ...

Sans oublier que ces composés, très proches les uns des autres semblent pouvoir s'isomériser avec une aisance relative.

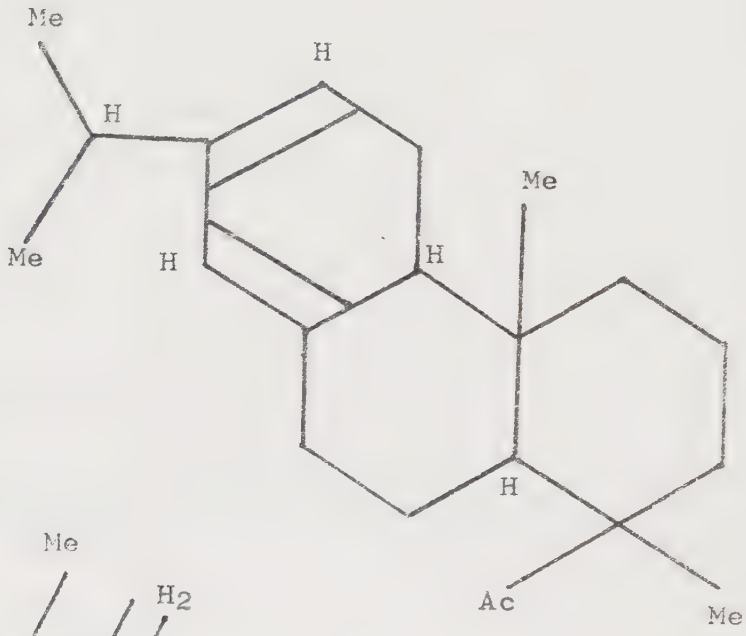
- Planche VI -

Podocarpaceae



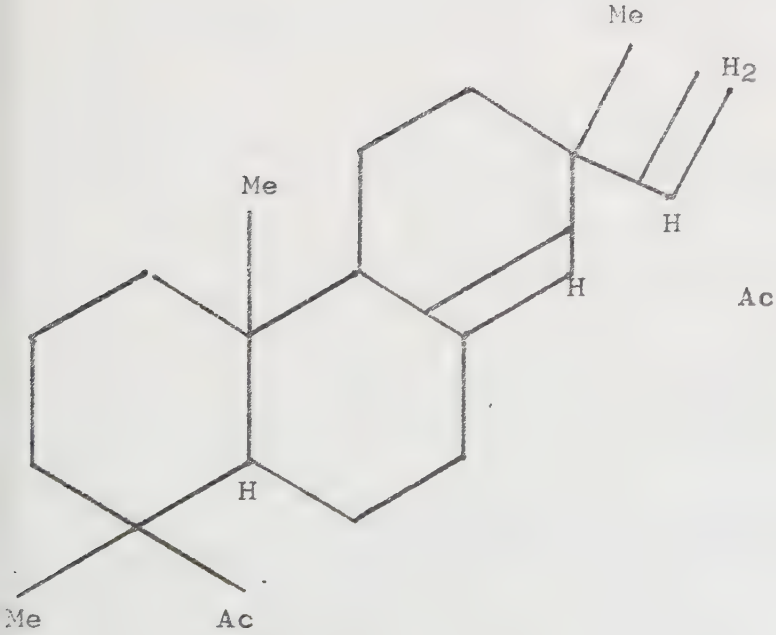
Acide Néoabiétique

$C_{20}H_{30}O_2$



Acide levopimarique

$C_{20}H_{30}O_2$



Acide dextropimarique

$C_{20}H_{30}O_2$

D'autre part, comme nous allons le voir, leur identification est très délicate. Leurs propriétés chimiques et physiques étant souvent très proches, les méthodes analytiques chimiques, aussi bien que les méthodes physiques, sont la plupart du temps insuffisantes.

Une recherche d'identification spectrométrique effectuée par FOLKS et coll. (10) à la suite d'études sur des résines de conifères, lui a permis de spectrer en U.V. un certain nombre d'acides diterpéniques de la famille de l'acide abiétique.

nom de l'acide	absorption max. en mμ
abiétique	240
néoabiétique	250
lévopimarique	270
palustrique	260
d'Hampton	233
non identifié	205

Entre 200 et 300 mμ, ils ont pu noter nettement les maxima sans pouvoir déterminer des absorptions pour les acides suivants :

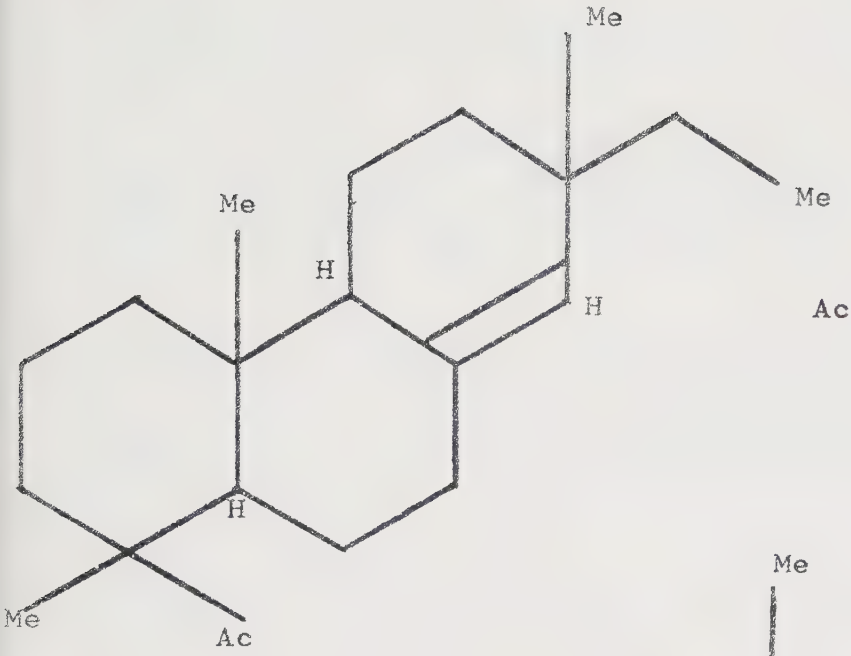
dihydropimarique
tétrahydropimarique
destropimarique
isodextropimarique

Ils ont remarqué qu'un des réactifs spécifiques de l'acide tétrahydroabiétique était le chlorure de fer.

Après avoir pris conscience de ces difficultés, nous avons décidé d'utiliser ces divers résultats comme des

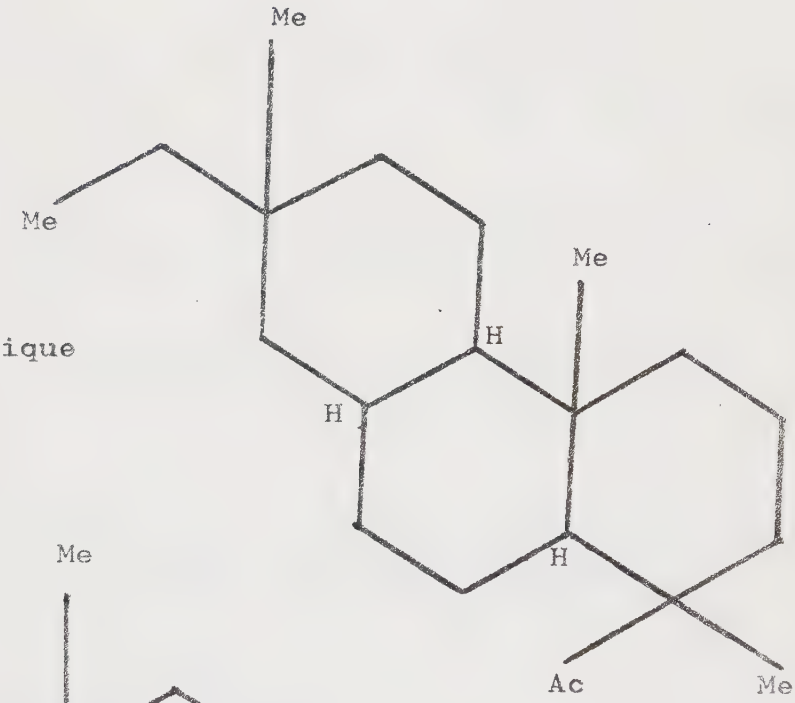
- Planche VII -

Podocarpaceae



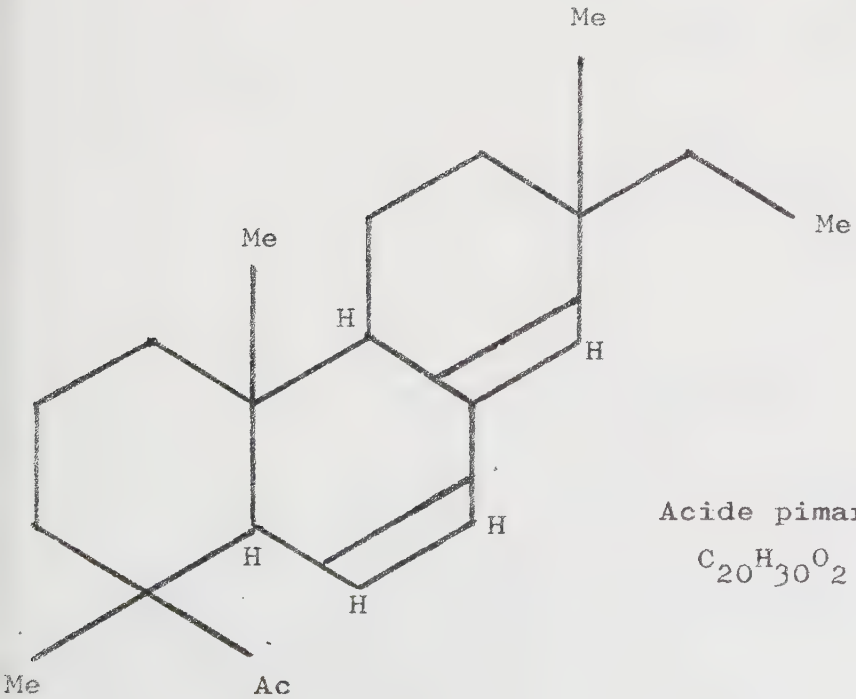
Acide dihydropimarique

$C_{20}H_{32}O_2$



Acide tétrahydropimarique

$C_{20}H_{34}O_2$



Acide pimarique

$C_{20}H_{30}O_2$

moyens d'approche et non comme des références. Nous donnerons un exemple de cette utilisation.

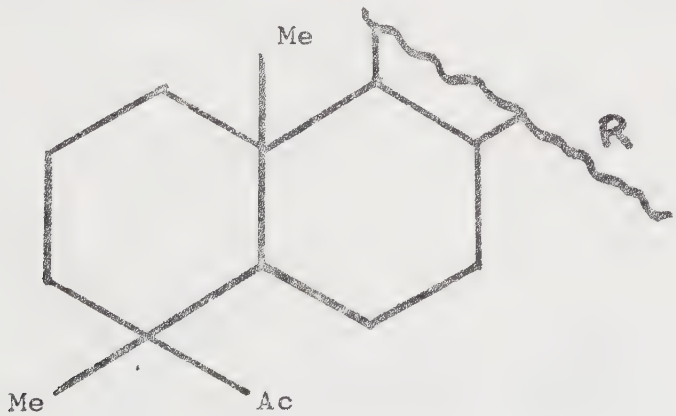
D.O. HUMMEL (14) donne les références" spectrales suivantes sur des mesures spectrométriques I.R. effectuées en phase solide à l'aide de pastille de KBr dans l'intervalle de 2,5 à 19 μ (soit 4.000 à 400 cm^{-1}) :

nom de l'acide	groupement fonctionnel	bande
acide abiétique	ν (C = O)	5,90 μ ou 1.695 cm^{-1}
anhydride abiétique	ν (C = O)	5,55 μ et 5,77 μ ou 1.800 et 1.735 cm^{-1}
13-hydroxyabiétilactone	ν (C = O)	5,63 μ ou 1.775 cm^{-1}

Nous avons pris la première ligne du tableau :

acide abiétique ⟶ ν(C = O) ⟶ 1.695 cm^{-1}

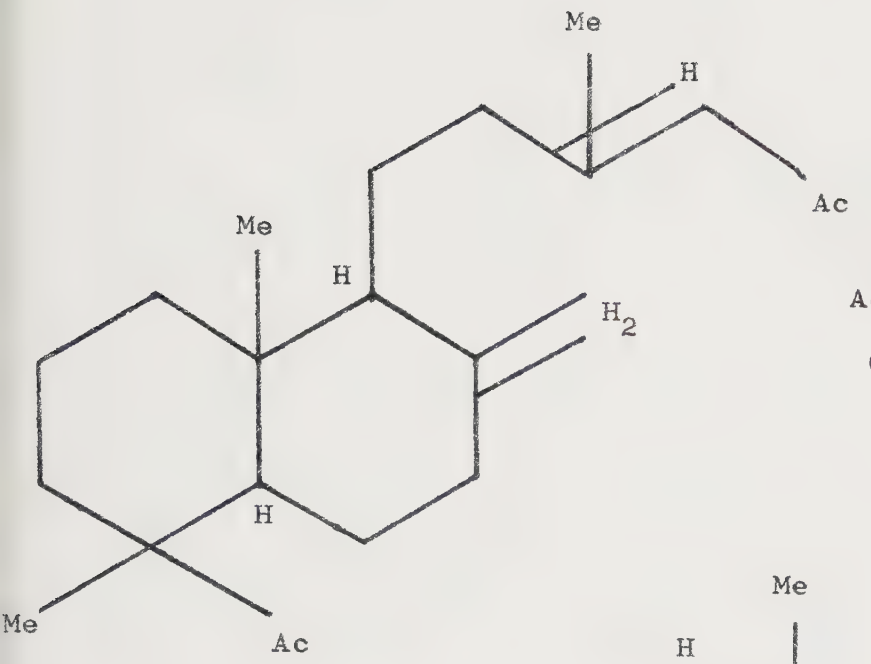
Nous avons vérifié que la référence était exacte avec de l'acide abiétique de référence. Puis, nous avons spectré toute une série de produit de référence présentant l'enchaînement suivant :



R étant exempt de fonction anhydride, lactone, ester, cétone, aldéhyde, éther-oxyde.

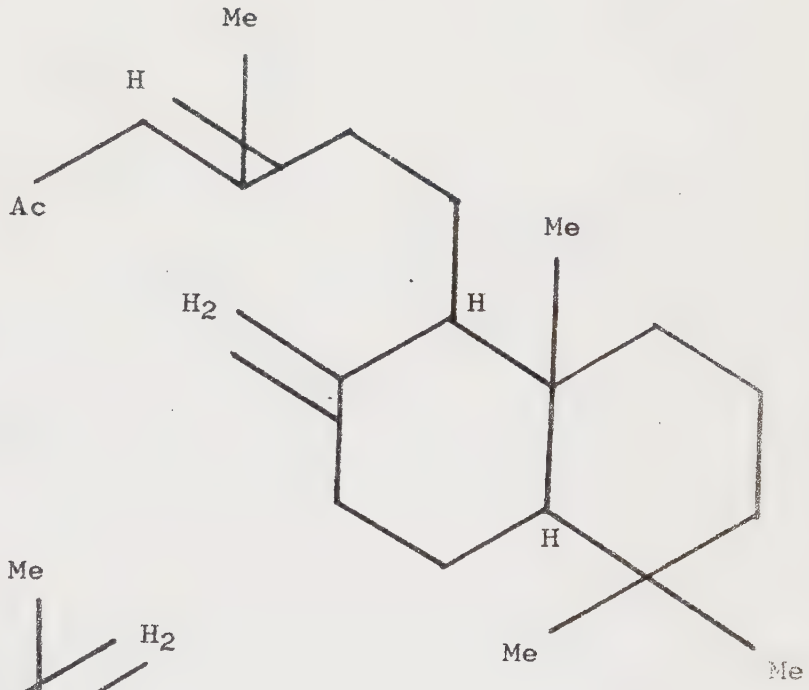
- Planche VIII -

Labdaceae



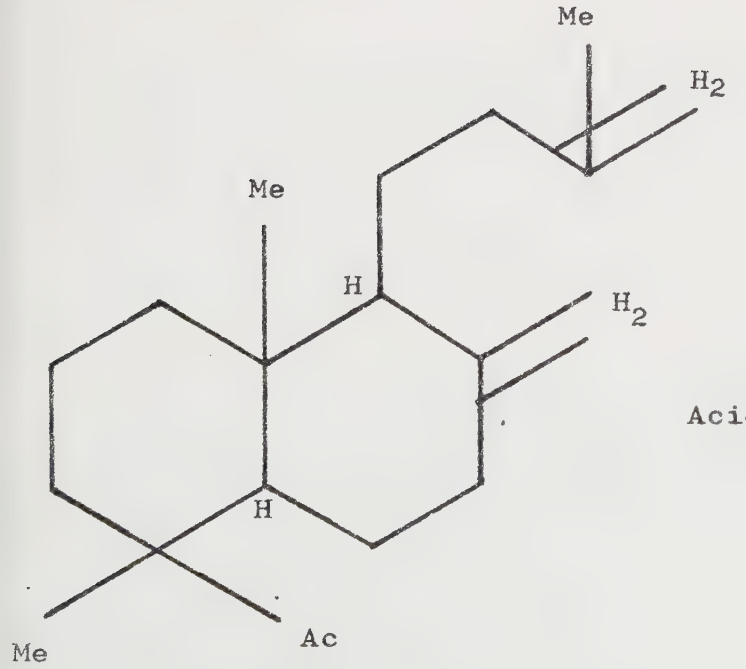
Acide agathique

$C_{20}H_{32}O_4$



Acide copalique

$C_{20}H_{32}O_2$



Acide noragathènecarboxylique

$C_{19}H_{30}O_2$

Pour tous ces composés, nous avons obtenu :

composé ⟶ ν (C = O) ⟶ 1.695 cm^{-1}

Il en est de même pour les fonctions hydroxylées des composés de la même famille insaturés, c'est-à-dire pour presque tous les isomères de l'acide abiétique et pour les composés de la même famille.

Nous avons encore trouvé une étude spectrale en I.R. de l'acide abiétique et de ses isomères effectuée par H.H. BRUUN (6). Il constate qu'entre 4.000 cm^{-1} et 1.250 cm^{-1}, les spectres obtenus sont identiques. Les quelques légères différences résident en des bandes difficilesà attribuer, presque similaires, variant surtout en intensité, observées entre 1.250 cm^{-1} et 900 cm^{-1}. Les seules bandes qu'il a pu exploiter pour étayer ses déductions étaient situées entre 900 cm^{-1} et 700 cm^{-1}, et encore ces résultats étaient valables pour des produits de référence, à postériori.

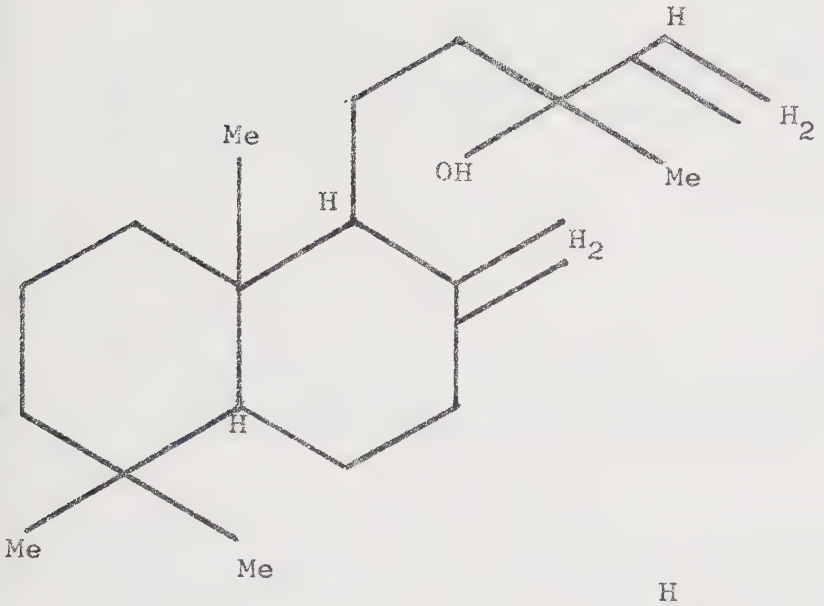
Quelques autres remarques relatives aux propriétés physiques de composés diterpéniques ont été relevées par nous. B.V. EROFEEV et coll. (8) ont pu déterminer des différences sur les spectres de rayons X des formes amorphes et cristallines de l'acide abiétique. Ces différences s'étendent aux spectres U.V. et aux mesures du pouvoir rotatoire. Or, l'obtention de ces formes allotropiques dépend étroitement des conditions d'extraction et nous avons pu constater que nous pouvions assez souvent obtenir un mélange des deux formes. Les différences observées lors des mesures physiques sont alors telles qu'il est difficile de savoir si l'on travaille bien sur l'acide abiétique et non sur un de ses proches.

W. KROHNSTADT a fait varier alternativement les pourcentages d'un mélange de deux isomères diterpéniques (par exemple 2 % de l'un et 98 % de l'autre ; 5 % et 95 % ; etc ... ; puis 98 % et 2 % ; etc ...). Ila pu alors constater que les spectres U.V. ne variaient pas sensiblement, alors que les points de fusion des mélanges étaient très différents et que dans certains cas, la cristallisation ne pouvait s'effectuer totalement ou partiellement.

Il nous a semblé important de retenir de ce travail que le critère de pureté était primordial et devait rigoureusement présider à toute recherche d'identification de produits de ce type. D'autant plus que ces études pouvaient être à nouveau faussées par le phénomène du même ordre observé par

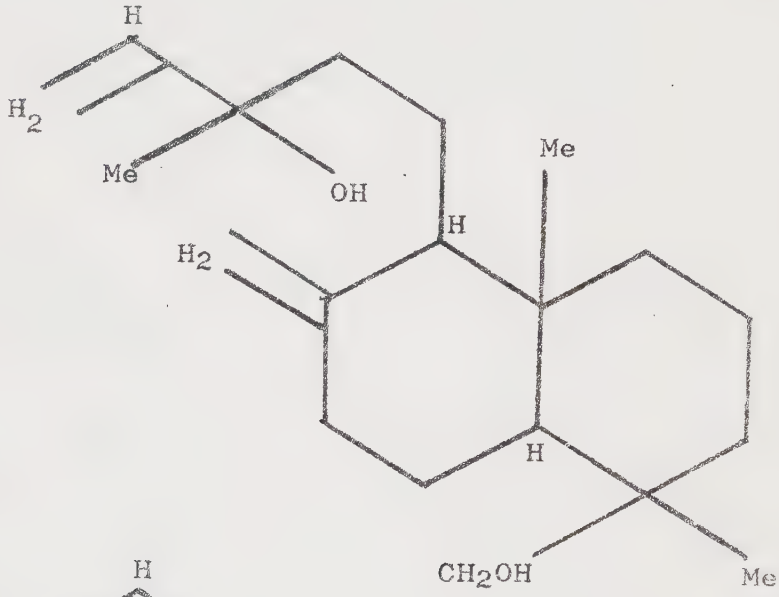
- Planche IX -

Extraits du Cyprés



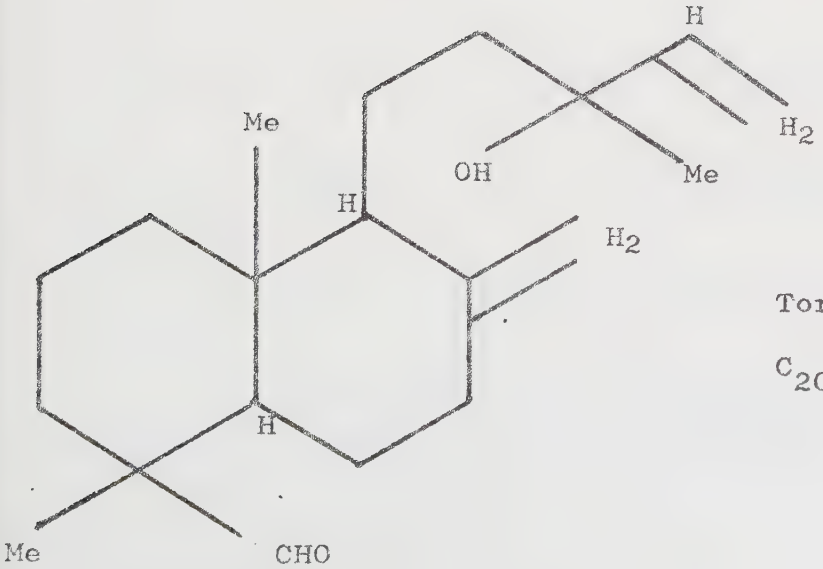
Manool

$C_{20}H_{34}O_2$



Torulosol

$C_{20}H_{34}O_2$



Torulosal

$C_{20}H_{32}O_2$

AKIRA TAHAO (25) sur les mélanges d'isomères optiques d'acides diterpéniques.

En nous gardant de toute conclusion hâtive et avec une prudence inspirée par les difficultés signalées précédemment, nous avons procédé à une étude d'identification analogique déductive.

II.- Mesures effectuées sur l'acide abiétique et les composés de la même famille (Podocarpaceae)

Ces acides étant les constituants principaux des fractions acides non volatiles extraites de conifères, il nous a semblé utile d'effectuer une étude de ces produits comparable à celle effectuée sur les produits VIII et XII, constituants principaux d'une fraction acide non volatile extraite d'un conifère, dont certains composants ont déjà été identifiés comme proches parents des podocarpaceae.

a) Analyse élémentaire

Pour l'acide abiétique :

C = 79,42 %
H = 9,99 %
O = 10,58 %

La microanalyse a été conduite dans les mêmes conditions que pour les produits VIII et XII.

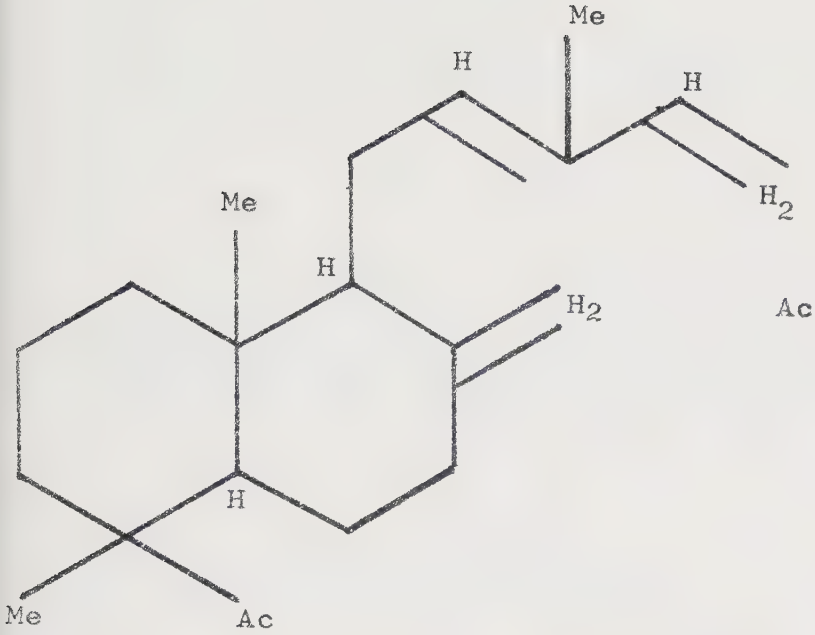
Pas de trace d'autres éléments, produit non hygroscopique.

Cette analyse nous donne une formule brute calculée $C_{20}H_{30}O_2$ avec M = 302.

Pour les autres composés, les formules brutes calculées d'après le pourcentage des éléments constituants varient de $C_{20}H_{28}O_2$ à $C_{20}H_{32}O_2$ et M varie de M = 300 à M = 304.

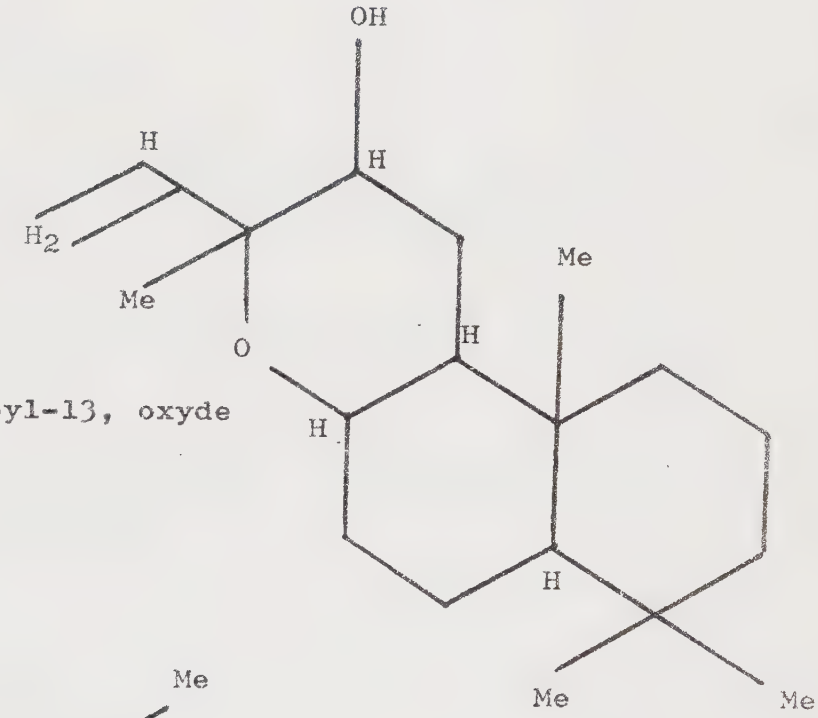
- Planche X -

Extraits du Cyprés



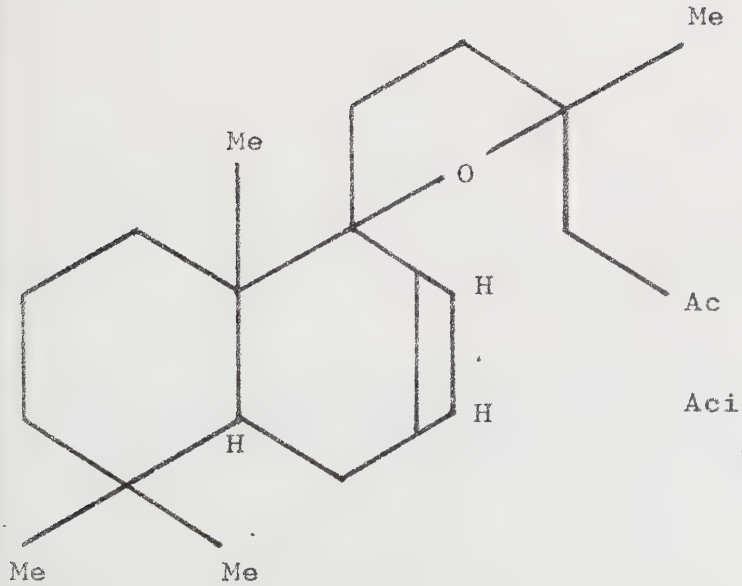
Acide communique

$C_{20}H_{30}O_2$



Hydroxy-12, α -épimanoyl-13, oxyde

$C_{20}H_{34}O_2$



Acide guindélique

$C_{19}H_{31}O_3$

b) Polarimétrie

Les résultats obtenus, par la mesure des pouvoirs rotatoires des différents échantillons, sont très variables.

$$-116° \leqslant \alpha_D^{25} \leqslant +230°$$

Nous n'avons pu en tirer aucun renseignement précis et utilisable pour nos investigations. D'autant plus que nous avons pu nous rendre compte que l'ordre de grandeur de ces résultats variaient sensiblement d'une marque de produit de référence à une autre, ainsi que selon l'échantillon considéré.

c) Spectrométrie U.V.

Nous avons limité notre étude dans la zone du spectre U.V. utilisable entre 200 mμ et 300 mμ. Les résultats obtenus sont approximativement ceux trouvés dans la littérature et cités précédemment.

Seuls des acides tels que les acides tétrahydroabiétique et tétrahydropimarique n'ont pas d'absorption notable dans cette zone de spectre.

Ces résultats ont pu nous renseigner sur l'existence possible de groupements chromophores, mais ne nous ont pas fourni de points de comparaison.

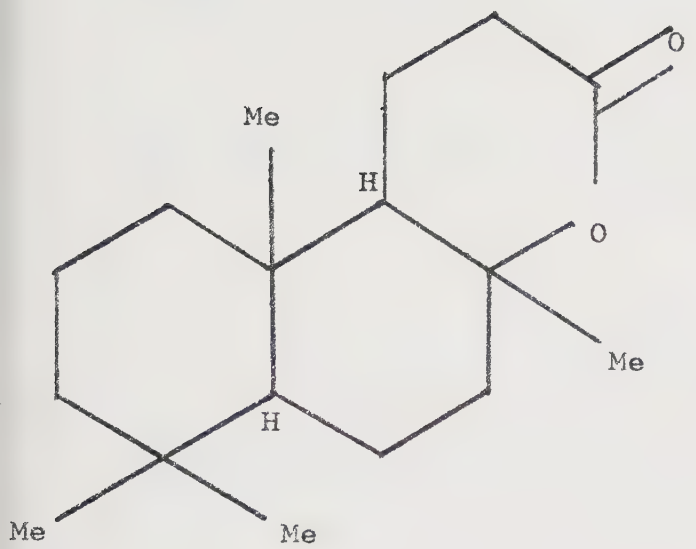
d) Spectrométrie de masse

D'aucune utilité lorsque nous avons essayé de les utiliser pour déterminer les isomères de chaîne entre les produits VIII et XII, par exemple, les spectres de masse ont été précieux pour comparer les structures générales des différents échantillons et notamment, pour rapprocher les produits VIII et XII de la famille des podocarpaceae.

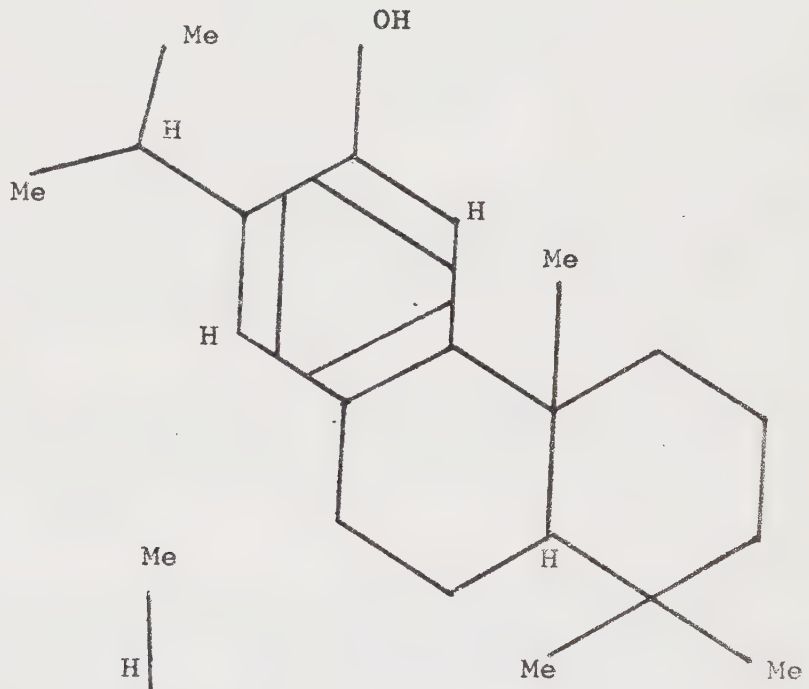
Il nous est apparu que tous les spectres, y compris ceux des produits VIII et XII, montraient une analogie presque parfaite, mis à part quelques rares pics correspondant aux changements de formules brutes de $C_{20}H_{28}O_2$ à $C_{20}H_{34}O_2$. En

- Planche XI -

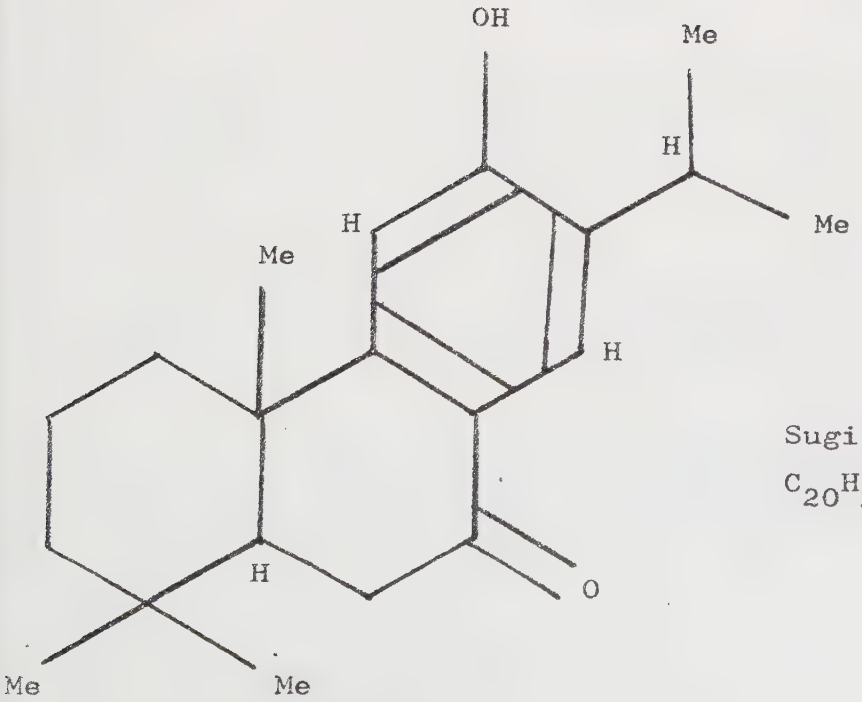
Extraits du Cyprés



Ambréinolide
$C_{17}H_{28}O_2$



Hinokiol
$C_{20}H_{30}O$



Sugiol
$C_{20}H_{28}O_2$

tenant compte du fait que les produits VIII et XII se déshydrataient pendant les mesures, comme nous nous en sommes aperçus en comparant les résultats spectrométriques et les résultats de l'analyse élémentaire.

Ces résultats n'ayant été employés qu'à titre indicatif, nous avons pensé qu'il était hors de propos d'en donner ici une liste exhaustive.

e) Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

De la même façon, nous avons procédé à une série de mesures systématiques en R.M.N. Nous ne signalerons que les résultats que nous avons utilisés. D'ailleurs, ces spectres, très complexes, ne présentent que peu de pics qu'il nous a été possible d'identifier ou d'attribuer à posteriori.

Suivant les échantillons analysés, nous avons observé deux, trois ou quatre singulets toujours situés dans la zone de glissement comprise entre 0,55 ppm et 1,28 ppm. Les signaux d'intégration 3 correspondant aux différents groupements methyl portés par les différentes molécules.

Pour les acides abiétique, déhydro-, tétrahydro-, déhydro-, abiétadiénoïque, palustrique, levopimarique, nous avons noté vers 1,4 ppm, un doublet d'intégration 6 correspondant au groupement isopropyl.

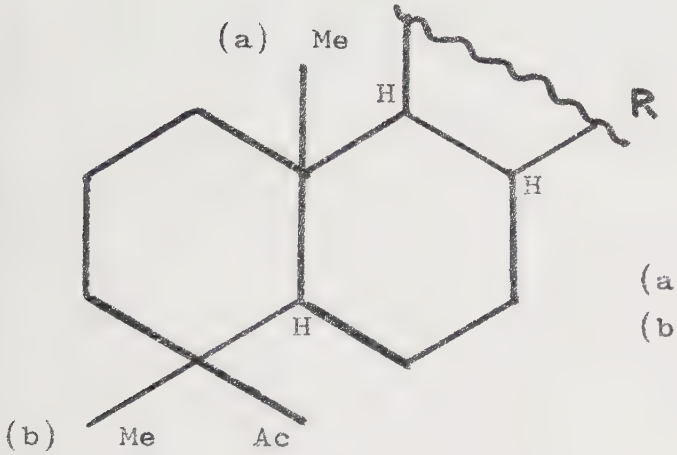
Entre 4,6 et 6,6 ppm, nous avons trouvé des massifs assez difficiles à attribuer nettement, mais correspondant certainement aux signaux correspondant à des protons éthyléniques. Ces massifs étant absents dans les acides saturés.

Le signal correspondant au proton acide de ces divers composés n'a pas toujours été mis en évidence par les spectres R.M.N., notamment pour les acides abiétiques, communiques et dérivés, ainsi que pour le produit XII.

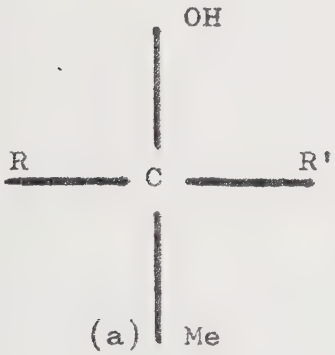
Dans la région des spectres comprise entre 0,4 ppm et 2,5 ppm, les massifs importants, d'allure générale semblable, correspondants aux enchaînements -CH, $-CH_2$, des cycles hexaniques ou hexéniques n'ont pu être détaillés.

Cependant, certaines analogies, très reproductibles, attachées à des séries de motifs, nous ont fourni de puissants outils d'investigation lorsque nous avons tenté d'établir les formules développées des produits VIII et XII.

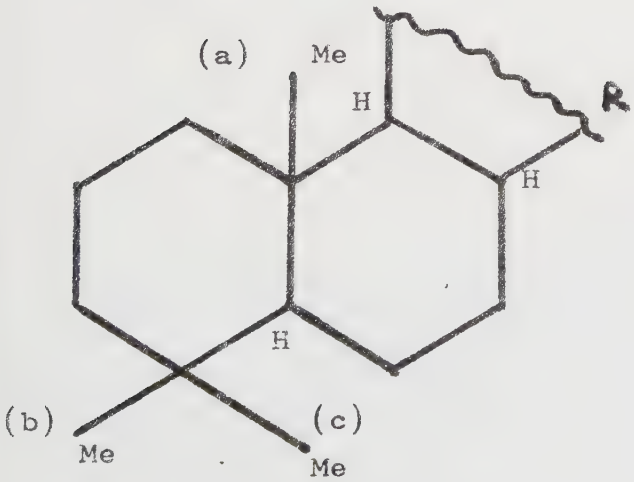
Par exemple, dans les séries de motifs :



(a) toujours entre 0,5 et 0,75 ppm
(b) toujours entre 1,15 et 1,28 ppm



(a) toujours entre 1,15 et 1,28 ppm

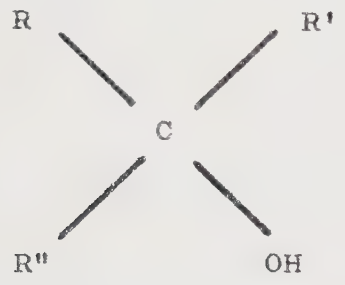


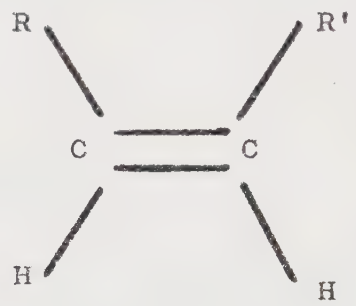
(a) toujours entre 0,5 et 0,75 ppm
(b) " " 0,6 et 0,8 ppm
(c) " " " " "

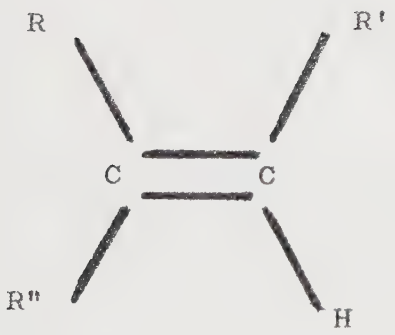
f) Spectrométrie infra-rouge

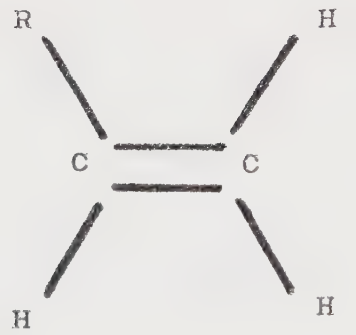
A première vue, les spectres infra-rouges de ces différents composés semblent tous identiques à ceux des produits VIII et XII.

Un examen plus attentif révèle cependant les différences. Si les grands motifs (bande large des ν - OH de l'acide centrée sur 2.950 cm^{-1}, bande forte des ν C = O de l'acide centrée sur 1.695 cm^{-1}) restent inchangés, un certain nombre de bandes attribuées à un des motifs tel que :









apparaissent, s'intensifient, s'affaiblissent, ou disparaissent. C'est ainsi que dans la région située au-dessus de 3.500 cm^{-1}, l'étude en dilution montre l'apparition ou la disparition de la bande à 3.560 cm^{-1} correspondant aux vibrations des - OH de la fonction alcoolique.

A 1.780 cm^{-1}, 1.650 cm^{-1}, 1.600 cm^{-1}, l'apparition ou la disparition de bandes attribuées aux vibrations ν (C = C) vinyliques et δ (- OH) apparaissent ou disparaissent.

Une tendance générale nous a semblé se confirmer après examen de tous ces spectres : les bandes caractéristiques examinées sont toujours les mêmes dans une série, nous n'avons pas de bandes caractéristiques d'un composé, mais d'une série de composés.

Ces résultats en spectrométrie I.R. nous ont été utiles pour étayer les résultats douteux des tests analytiques classiques et le défaut de caractérisation du proton acide en R.M.N. par exemple.

g) Mesure des points de fusion

Très variables, les résultats obtenus par cette méthode, ne nous ont pas paru plus facilement exploitables, que ceux obtenus en polarimétrie, pour une étude analogique. Assez reproductibles pour un composé de même origine, les mesures du point de fusion ne nous ont servi que de critère de pureté pour les produits à spectrer.

A titre d'exemple, pour les acides abiétiques, nous avons obtenu des résultats se situant dans la fourchette :

P_f = 169°C à 176°C
(théorique : 171°C - 172°C)

- pour les acides dihydropimariques :
P_f = 157°C à 168°C
(théorique : 166°C - 168°C)

- pour les acides lévopimariques :
P_f = 148°C à 156°C
(théorique : 150°C)

- pour les acides néoabiétiques :
P_f = 162°C à 171°C
(théorique : 167°C - 169°C)

h/ Tests analytiques

En règle générale, porteurs des mêmes fonctions, les composés testés ont réagi sensiblement de la même façon que les produits VIII et XII.

Recherche des doubles liaisons

- Action du brome -

Tous les acides porteurs de doubles liaisons ont réagi positivement et plus ou moins sensiblement à ce test.

- Test de Bayer -

Même remarque pour ce test dans l'ensemble moins sensible que le test du brome.

Recherche de la fonction acide -

Les acides ont réagi plus ou moins au test du carbonate de soude et du bicarbonate de soude. Pour les tests de solubilité dans la soude ou dans la potasse, nous avons pu observer que certains acides étaient plus ou moins solubles dans l'une ou l'autre de ces bases, rarement dans les deux à la fois.

Recherche des aldéhydes, cétones, esters, lactones, phénols

Les divers tests effectués sur les composés envisagés ont tous donné des résultats négatifs.

Recherche de la fonction alcool

Les tests ont été faits sur les composés qui n'étaient pas porteur de fonction alcoolique et ont donné des résultats

dans l'ensemble négatifs, les ambiguités s'étant trouvées abolies d'un test à l'autre.

i) Remarques -

Cette étude analogique nous a permis de noter, en outre, quelques observations : comme les produits VIII et XII, les divers acides étaient,

- insolubles dans l'eau,

- solubles dans les solvants courants (méthanol, éthanol, benzène, hexane, éther sulfurique, éther de pétrole, chloroforme, tétrachlorure de carbone, acétone, sulfure de carbone, acétate d'éthyle et butyle),

- solubles préférentiellement dans les solutions relativement concentrées de soude ou de potasse.

Ces divers produits avaient une couleur jaune clair, en solution, couleur d'ailleurs plus ou moins marquée.

Ils cristallisent presque tous dans le mélange méthanol-eau à 0°C, pendant une durée variable.

Nous avons remarqué, ainsi, que l'acide abiétique obtenu, à partir d'une colophane, par le même type de procédé d'extraction employé pour les produits VIII et XII conduisait, quelle que soit l'origine de la colophane, à un produit amorphe et non cristallisé, comme pour les deux composés isolés à partir des fruits du cyprés.

L'acide abiétique ainsi obtenu, d'autre part, est très légèrement coloré en beige, alors que les produits VIII et XII sont parfaitement blancs.

De plus, les acides du cyprés sont solubles dans le mélange :

benzène - éther de pétrole - ammoniaque

alors que l'acide abiétique donne un précipité brun rouge.

Le contrôle chromatographique effectué dans les mêmes conditions que pour les produits VIII et XII, nous a révélé dans tous les cas, un spot de Rf 0,80, très intense.

En résumé, nous avons pu noter quelques différences et quelques ressemblances entre les podocarpaceae et les produits VIII et XII.

Ressemblances

Ces divers composés sont tous des extraits naturels de conifères.

Formule brute de base :

$C_{20}H_{28}O_2$ à $C_{20}H_{32}O_2$

(si l'on ne tient pas compte de la molécule d'H_2O dûe à la présence d'une fonction alcool dans les produits VIII et XII).

Spectres I.R.

Les spectres possèdent tous une ressemblance étonnante qui les différencie au premier coup d'oeil de tous autres types d'acides naturels.

Chromatographie en C.C.M.

Elle révèle les mêmes spots pour tous ces produits.

Spectres U.V.

Les composés absorbent tous approximativement dans les mêmes régions du spectre.

Spectres R.M.N.

Les signaux observés et leurs glissements chimiques sont sensiblement les mêmes pour des modèles structuraux identiques.

Différences

Elles résident essentiellement dans les différences de méthodes de cristallisation, les différences de solubilité (notamment dans les bases fortes : soude, potasse, ammoniaque), l'absence ou la présence de bandes I.R., fines ou de signaux R.M.N. (signal du proton alcoolique par exemple). Plus subjectivement, dans la couleur et l'odeur des produits solides ou en solutions, la forme des cristaux.

Recherche d'une formule développée du produit VIII

Les résultats des études précédentes nous ont amenés à envisager l'hypothèse d'un acide-alcool diterpénique bicyclique.

La spectrométrie de masse, avec une masse

$$M = 302$$

nous donne, pour un composé ne contenant que les éléments C, O, H, une formule brute

$$C_{20}H_{30}O_2$$

L'analyse élémentaire, apparemment en contradiction avec l'analyse spectrographique de masse, nous a conduit à une formule brute calculée :

$$C_{20}H_{32}O_3$$

dont nous tirons pour valeur approchée de la masse molaire :

$$M = 320$$

Nous avons alors considéré le fait qu'en spectrométrie de masse, les alcools perdent très facilement une molécule d'H_2O ($M = 18$) ce qui répondait à la fois à la question des différences entre la masse molaire mesurée en spectrométrie de masse et la masse molaire calculée d'après les résultats de l'analyse élémentaire.

Les renseignements fournis par la polarimétrie, à cause des grandes variations existant d'une mesure à une autre pour le même produit, nous ont suggéré que nous étions vraisemblablement en présence de mélanges variables d'isomères optiques.

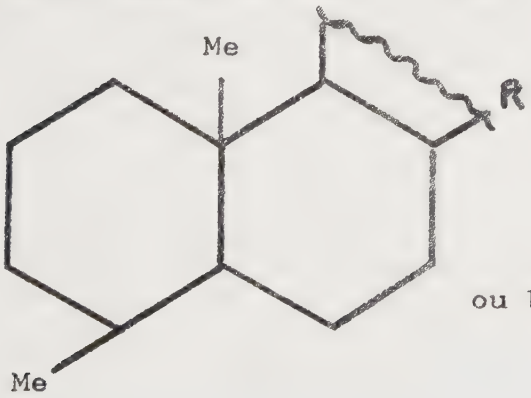
Par ailleurs, le calcul nous indiquait que nous avions cinq centres d'insaturation sur les molécules. Nous pouvions donc envisager les arrangements suivants en l'absence de cycles aromatiques :

- 5 doubles liaisons,
- 1 triple liaison et 2 doubles liaisons,
- 5 cycles hexaniques ou 2 cycles hexéniques et 1 double liaison,
- 1 composition des deux types d'insaturation,
- 1 ou plusieurs carbonyles.

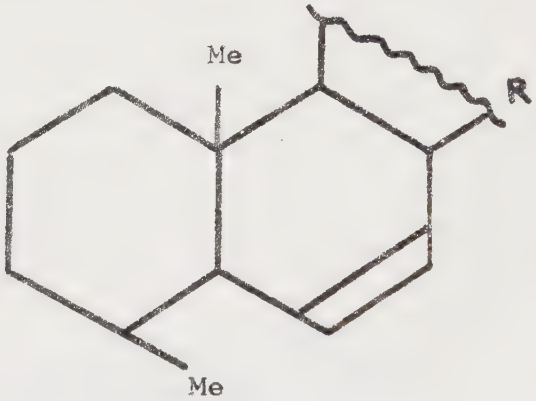
L'analyse élémentaire nous a permis d'éliminer immédiatement la possibilité de présence de plus d'un carbonyle.

Les études I.R., R.M.N., U.V., et les tests analytiques nous ont évité de nous attarder à envisager des solutions telles que la présence de six doubles liaisons, de triples liaisons ou de six cycles hexaniques. Il nous restait donc à considérer une composition de cycles hexaniques ou hexéniques avec un carbonyle, un hydroxyle vraisemblablement tertiaire et trois groupements methyl.

L'étude comparative avec les podocarpaceae nous avait démontré qu'il existait entre eux et les produits VIII et XII, des liens de parenté structuraux. En considérant les formules développées de quelques-uns des représentants de cette famille (Planches n° III à XI), nous avons pu en dégager les motifs structuraux de base suivants :



ou bien :

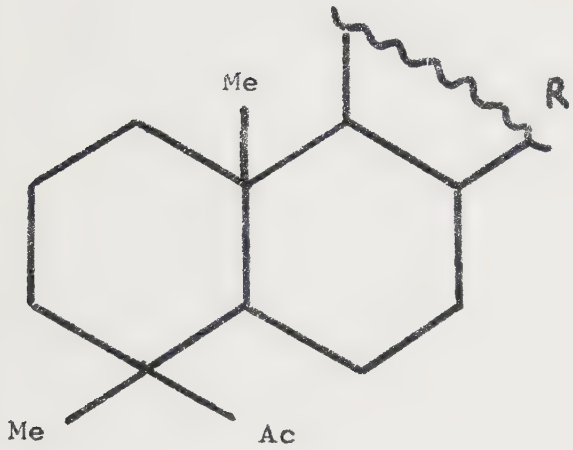


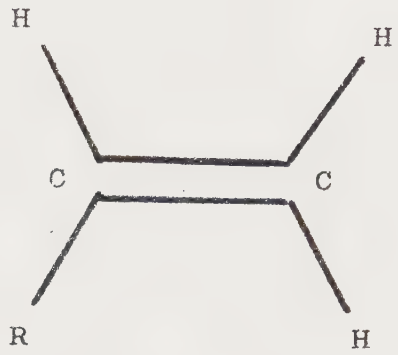
Il nous restait à situer correctement :

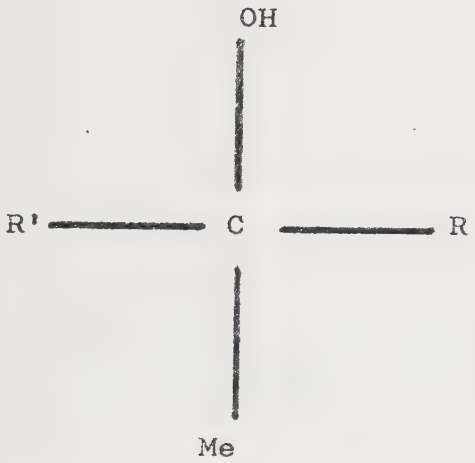
- Deux ou trois centres d'insaturation (dont un carbonyle
- La place du troisième méthyl et de l'hydroxyle,
- Le reste de la chaîne hydrocarbonée,

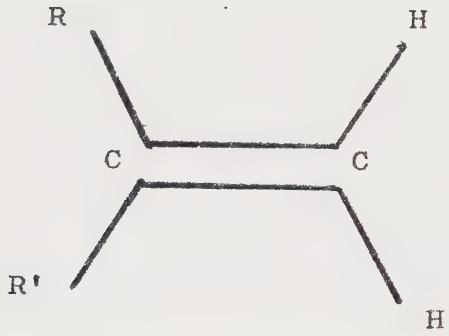
et à confirmer ou infirmer l'existence d'un cycle hexénique.

Or, l'étude des spectres R.M.N. nous a permis d'envisager quatre types de motifs :









Nous avons alors dressé une liste de formules développées de composés bicycliques diterpéniques extraits du cyprés (Planches n° VIII à XI).

Présentant un intérêt seulement documentaire, des molécules comme l'ambréinolide, l'hinokiol ou le sugiol,

n'ont pas retenu notre attention, leur fonction lactones, aromatiques ou cétoniques les rendant impropres à toute comparaison avec les produits VIII et XII.

Par contre, des produits renfermant une fonction alcool tertiaire comme :

- le manool,
- le torulosol,
- le torulosal,

ou une fonction acide commune :

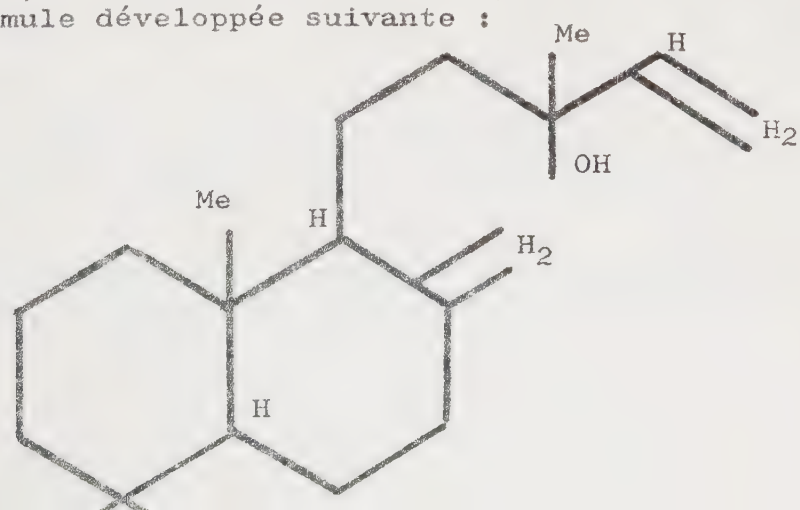
- l'acide communique

présentaient pour nous un avantage double :

- même origine végétale que les produits VIII,
- même motif structural de base,
- un motif pour le - OH conforme aux analyses,
- un groupement vinyl et son enchaînement,
- une double liaison terminale et son enchaînement,
- une formule brute très proche de celle du produit VIII (surtout pour le torulosol),
- les spectres R.M.N. du manool ressemblent étrangement aux spectres du produit VIII (à l'exception de l'emplacement de deux méthyl dont un supplémentaire) et éliminent du même coup la possibilité d'un cycle hexénique.

Ces considérations nous ont amené à proposer pour le produit VIII, en accord avec les analyses et l'étude comparative, la formule développée suivante :

Produit VIII



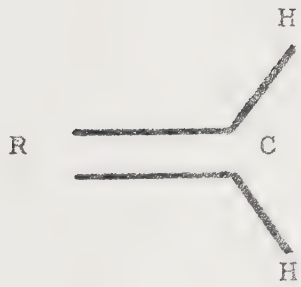
Nous avons pu vérifier que cette formule développée répondait bien à la formule brute $C_{20}H_{32}O_3$ et avait une masse molaire M = 320.

Recherche d'une formule développée du produit XII

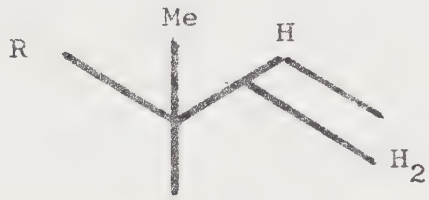
Pour rechercher une formule développée représentant convenablement le produit XII, nous sommes partis du produit VIII.

Les analogies entre ces deux produits nous ont fait penser qu'il s'agissait vraisemblablement, soit d'isomères de chaînes, soit de position.

Sur la formule développée attribuée au produit VIII :



éthyténique terminal



Vinyl

OH en du vinyl

Nous notons :

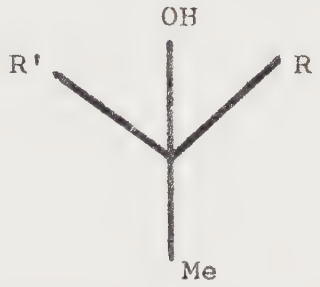
- un groupement vinyl,
- un groupement éthylénique terminal
- un - OH et un méthyl en α du groupement vinyl

Or, en examinant les spectres R.M.N., si nous retrouvons les pics correspondant au méthyl et à la fonction

acide portée par le cycle hexanique, nous ne trouvons pas trace du motif éthylénique terminal ($R_2 = CH_2$). De plus, le proton alcoolique et le méthyl lié sont moins démasqués.

En U.V., l'absence d'absorption dans la région comprise entre 200 et 300 mμ, alors que le produit VIII absorbe, tend à prouver qu'une des doubles liaisons a disparu.

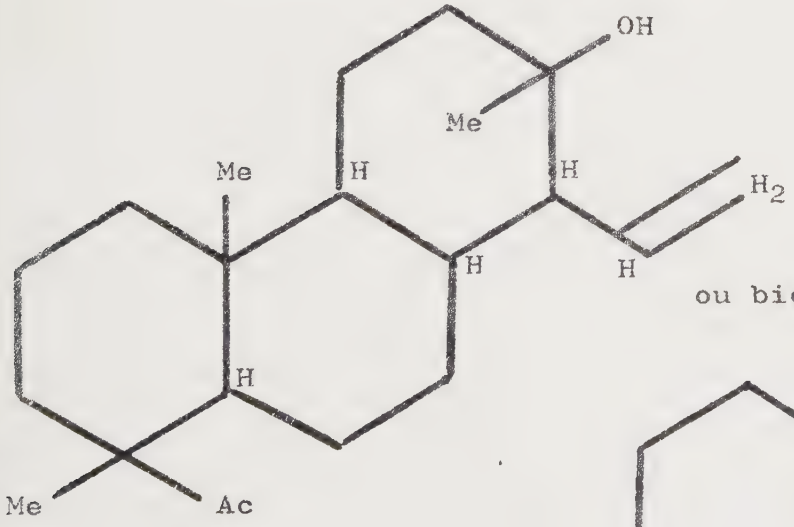
D'autre part, le démasquage atténué du groupe



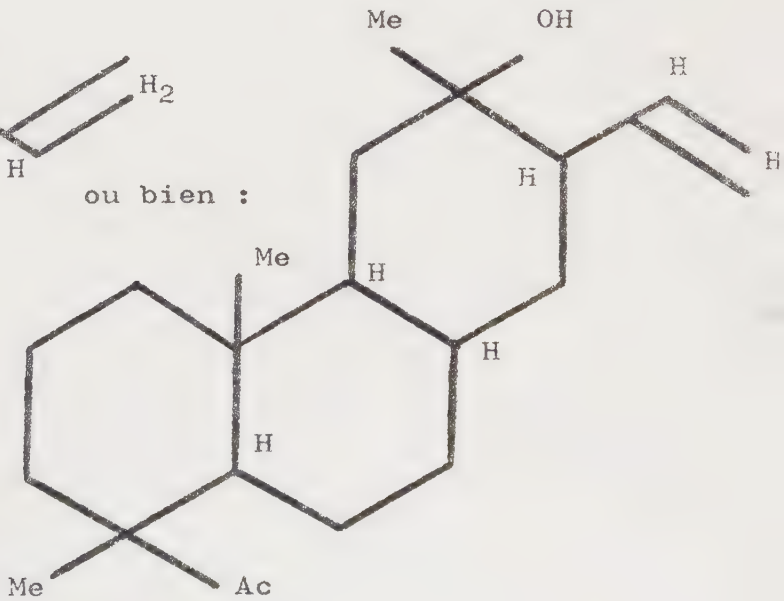
nous a semblé vouloir signifier que ce groupement n'était plus en α, mais en β du groupement vinyl.

Nous avons alors considéré le fait que le nombre de centres d'insaturations était le même et nous en avons déduit qu'un nouveau cycle hexanique avait pu se former.

Nous avons donc envisagé la possibilité des deux formules développées suivantes pour le produit XII.



ou bien :



Remarque

Etant donné la diminution de l'acidité du proton alcoolique, liée en sa position en β, nous avons pensé qu'il pourrait en résulter une diminution de la force des liaisons intermoléculaires (du type Van der Walls, par exemple) ce qui pourrait expliquer l'abaissement du point de fusion.

- CONCLUSIONS -

Comme nous l'avions pressenti au début de ce travail, l'étude botanique, le respect des conditions de récolte et de stockage ont été une étape préliminaire nécessaire.

Nous nous étions proposés de préciser la composition chimique des galbules de cyprés (cupressus sempervirens, var. Horizontalis), en portant notre effort sur la fraction terpénique non volatile :

Le peu de renseignements fournis par la littérature sur ce sujet nous a conduit à imaginer quelques méthodes d'extraction, de purification et de contrôle.

De même, le manque de références concernant les deux espèces chimiques ainsi isolées a rendu leur identification délicate.

Notre travail a été conduit en deux temps :

- Isolement de deux des constituants de cette fraction terpénique non volatile,

- Identification des deux composés isolés.

- Isolement de deux des constituants de la fraction terpénique non volatile du Cupressus Sempervirens var. Horizontalis -

Tout d'abord, nous avons séparé la fraction terpénique non volatile des autres constituants des galbules.

Après chromatographie en couche mince sur gel de silice, en utilisant comme solvant de migration le mélange benzène 50/méthanol 5 (en volume), nous avons pu observer sur le chromatogramme plusieurs spots.

Ces spots ont été révélés de différentes manières :

- Examen U.V. à 253 mμ

- Pulvérisation de vanilline sulfurique.

Parmi ces spots, deux étaient particulièrement intenses :

- l'un apparaissant en U.V. à 253 mμ
- l'autre n'étant révélé qu'après pulvérisation de vanilline sulfurique.

Considérant ces deux substances qui ont paru les plus abondantes, nous nous sommes attachés à leur isolement.

La séparation a d'abord fait appel à des précipitations fractionnées dans des mélanges méthanol-eau en proportions variables.

Nous avons pu ainsi observer que la substance, désignée par la suite sous le nom de Produit VIII, précipite d'abord, tandis que la substance désignée sous le nom de Produit XII précipite dans le mélange ou le méthanol est plus dilué.

En répétant ces opérations, nous avons pu procéder à une première purification de ces corps.

Les purifications ultimes n'ayant été possible qu'après avoir établi les solubilités respectives de chacune de ces substances.

En effet :

- Le produit VIII est insoluble dans les solutions ammoniacales et sodiques, soluble dans les solutions potassiques,

- Le produit XII est soluble dans les solutions ammoniacales, sodiques et potassiques.

Ces deux produits ont été isolés à l'état pur et nous avons tenté ensuite de les identifier.

- <u>Identification des deux composés isolés</u> -

L'identification de tels corps est une entreprise difficile, en raison du nombre d'isomères possible.

Nous ne rappelons ici que les caractéristiques physico-chimiques de ces deux substances qui se sont avérées être des acides diterpéniques.

- 1°) Produit VIII -

- Après nous être rigoureusement conformés aux conditions botaniques, de récolte et de stockage :

. même origine (terrain, variété),
. même saison (de Juin à Octobre),
. mêmes fruits (galbules encore verts),
. absence de stockage (traitement dans les 24 H suivant le ramassage),

- Après avoir utilisé , scrupuleusement, la même méthode d'extraction, dans les mêmes conditions de manipulatio pour tous nos extraits,

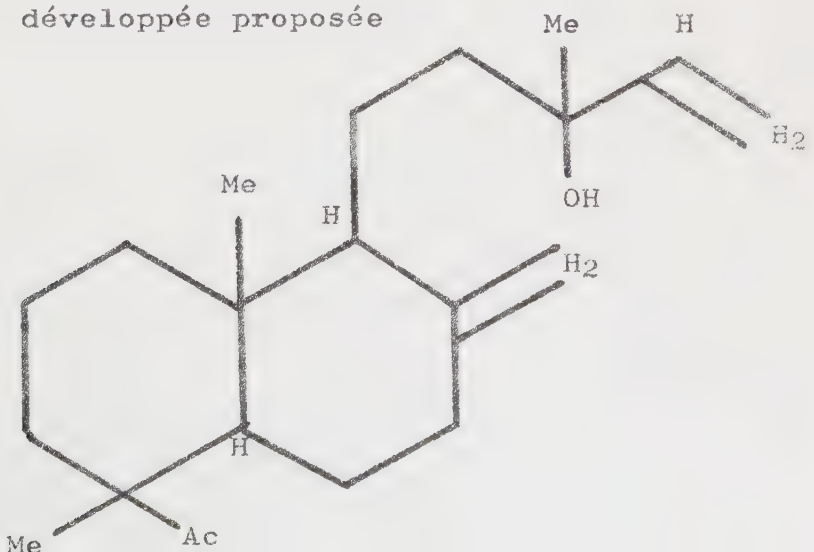
- Après avoir contrôlé que les étapes intermédiaires permettant d'arriver à l'isolement du produit VIII étaient identiques pour tous les échantillons.

- Nous avons pu isoler et mettre en évidence quelques caractéristiques physico-chimiques du produit VIII.

a) Formule brute

$C_{20}H_{32}O_3$

b) Formule développée proposée



c) Propriétés chimiques

. Présence de doubles liaisons exocycliques,
. Présence d'une fonction alcool tertiaire,
. Présence d'une fonction acide,
. Pas d'hydrogénation spécifique avec Al Li H_4

d) Propriétés physiques

Aspect : solide, blanc, cristallisé,
inodore, insipide,
non hygroscopique.

Solubilité :

Solubles dans les solvants organiques usuels (méthanol, éthanol, acétone, éther sulfurique, éther de pétrole, hexane, chloroforme, tétrachlorure de carbone, benzène),

Soluble dans les solutions aqueuses potassiques,

Insoluble dans les solutions aqueuses sodiques et ammoniacales,

Insoluble dans l'eau distillée,

Insoluble en solution aqueuse acide.

- Point de fusion : 116°-118°C

- Chromatographie couche mince : Rf $\sim$ 0,80-0,82

- Polarimétrie : $+14°12' \leq \alpha_D \leq +42°33'$

- Spectre U.V. : maximum d'absorption = 236 mμ
ε max. = 21.500

- Spectre de masse : M = 302 (déshydratation d'une mole d'H_2O)

Spectre RMN :

3 singulets d'intégration 3 à 0,62, 1,22, 1,70 ppm

1 pic d'intégration 1 à 11,4 ppm

1 massif d'intégration 1 entre 6,05 et 6,31 ppm

1 massif d'intégration 2 centré sur 5,27 ppm

1 pic d'intégration 1 centré sur 4,75 ppm

1 massif d'intégration 1 centré sur 5 ppm, massif important, non interprétable, entre 1 et 2,5 ppm

Spectre I.R. :

1 bande large ν (OH) à 3.525 cm^{-1}

1 bande ν (OH) à 2.950 cm^{-1}

1 bande ν (C = O) à 1.695 cm^{-1}

Diverses bandes caractéristiques de doubles liaisons entre 1.690 et 790 cm^{-1}

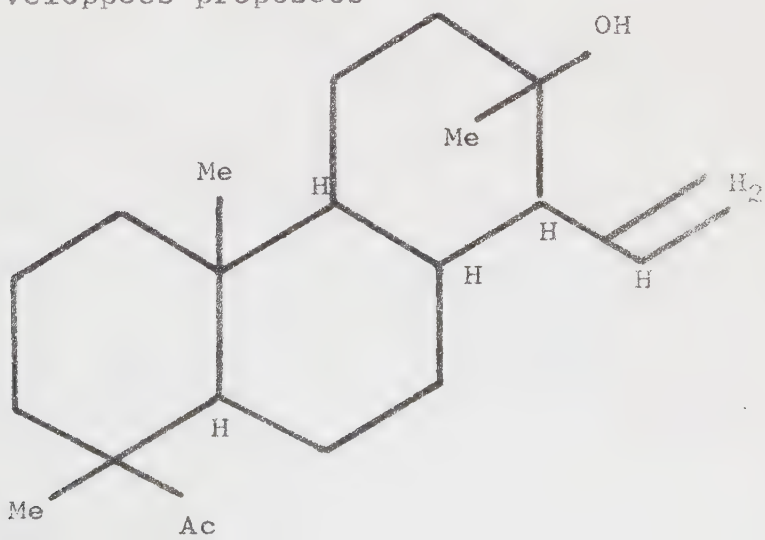
- 2°) Produit XII -

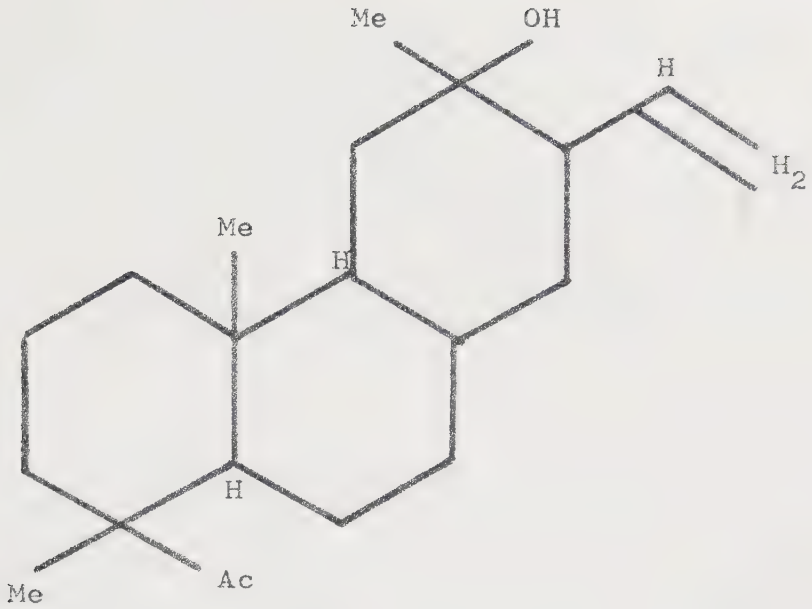
Après avoir pris les mêmes précautions (récolte, manipulation, etc ...) que pour le produit VIII, le deuxième composé isolé, que nous avons appelé produit XII, présente les caractéristiques physico-chimiques suivantes :

a) Formule brute

$C_{20}H_{32}O_3$

b) Formules développées proposées





c) Propriétés chimiques

. Présence de doubles liaisons exocycliques
. Présence d'une fonction alcool tertiaire
. Présence d'une fonction acide
. Pas d'hydrogénation spécifique avec Al Li H_4

d) Propriétés physiques

Aspect : solide, blanc, cristallisé,
inodore, insipide,
non hygroscopique

Solubilité :

Soluble dans les solvants organiques usuels (les mêmes que pour le produit VIII),

Soluble dans les solutions aqueuses ammoniacales, sodiques, potassiques,

Insoluble dans l'eau distillée,

Insoluble dans les solutions aqueuses acide.

- Point de fusion : 69 - 71°C

- Chromatographie en couche mince : Rf $\sim$ 0,32-0,35

- Polarimétrie : $+ 1°5' \leq \alpha_D \leq + 3°30'$

- Spectre U.V. : pas d'absorption notable entre 200 et 300 mμ

- Spectre de masse : M = 302 (déshydratation d'une mole d'H_2O)

- Spectre RMN :

  Pas d'intégration nette au niveau du pic acide,

  1 singulet d'intégration 3 à 0,55 ppm

  1 singulet d'intégration 6 à 1,18 ppm

  Entre 5,60 et5,90 ppm et à 4,85 ppm, uneensemble de massif d'intégration 3,

  1 pic centré sur 4,70 ppm

  Massif important, non interprétable entre 1 et 2,5 ppm

- Spectre I.R. :

  1 bande large ν (OH) à 3525 cm^{-1}

  1 bande ν (OH) à 2.950 cm^{-1}

  1 bande ν (C = O) à 1.695 cm^{-1}

  Diverses bandes caractéristiques de doubles liaisons entre 1.780 et 875 cm^{-1}.

Tels sont les deux acides diterpéniques que nous avons isolés. Il présentent des caractères physico-chimiques compatibles avec les formules développées que nous avons proposées.

Certes, comme nous l'avons annoncé et en raison du grand nombre d'isomères possible, ces formules peuvent être critiquables : c'est ainsi que dans le cas du produit XII, nous n'avons pu faire autrement que de proposer deux formules développées d'isomères possible.

Mais, les contingences matérielles, auxquelles nous avons été soumis dans le cadre étroit de ce travail de thèse, ne nous ont pas permis de pousser nos investigations plus avant.

En outre, nous avons pu nous rendre compte que le nombre d'espèces chimiques à isoler et à identifier, à partir des galbules de cyprés, était très important et pouvait faire l'objet de travaux ultérieurs.

- BIBLIOGRAPHIE -

(1) BALANSARD J.
J. Produits. Pharm. 7, 456 (1952)
. Présence d'acides glycolique et glycérolique dans les galbules de cyprés.

(2) BARBIN
Th. Mèd., Paris, (1931)
. Contribution à l'étude de l'énurésie
Essais chimiques du C. Sempervirens

(3) BARDYSHEV I.I. et CHERCHES Kh. A.
Dokady Akad. Nank. S.S.R., 116, 959-60 (1957)
. Constituants de la résine de Pin excelsea.

(4) BASLAS
Perfum. Essent. Oil Rec. G.B. 50, 10, 823 (1959)
. Essence de fruits de C. Sempervirens

(5) BENIGUI, CAPRA, CATTORINI
Piante medicinali 322 (1962)
. Principaux composants des huiles essentielles du C. Sempervirens.

(6) BRUUN H. H.
(Abo. Akad. Turku. Finland)
Paperi ja Puu 38, 577-82 (1956)
. Identification par spectrographie I. R. des acides abiétiques et primariques, et des dérivés.

(7) TURHAN BAYTOP et BAYHAN CUBUKCU
Labo. de Pharmagnosie, Istanbul, Turquie.
Plantes mèd. et phytothèr. Tome II, 3, 177-180 (1968)
. Recherches sur les constituants des feuilles et fruits de C. Sempervirens H. et P.

(8) EROFEEVB. V., NAUMOVA S. F. et ZARETSKII M. V.
(Vestsi Akad. Navuk Belarus, S.S.R.)
Fiz - Tekh Navuk. 2, 103-9 (1956)
. Propriétés physiques de l'acide abiétique amorphe.

(9) FENAROLI G.
Vostanze Aromatiche Naturali, Milano (1963)
. Huile essentielle de C. Sempervirens.

(10) FOKS, JANINA, ROZNEJ, ZBIGUIEV
Pr. Inst. Tecknol. Drewna. Pol. 14 (4), 135-43 (1967)
. Identifications U. V. des constituants d'une résine.

(11) GARNIER, BEZANGER-BAUQUESNE, DEBREUX
Ressources médicinales de la flore française,
Tome 1 (1961)
. Cupressus sempervirens

(12) GOEGG
Ann. de micrographie 1897)
. Recherches sur l'action bactéricide des tannins du
C. Sempervirens

(13) HERZ W.
Florida Stat. Univ. Tallahasee
J. Org. Chem. 30 (a) 3198-200 (1965)
. Isomères de l'acide abiétique.

(14) HUMMEL D. O.
Univ. Köln.
Farbe Lack, 72 (6), 317-25 (1966)
. Bandes I. R. usuelles pour l'identification de l'acide
abiétique et dérivés.

(15) PAAVO KAJANNE et ERKKI HONKANEN
(Finland. Inst. Teknol. Helsinski)
Paperi ja Puu 39, 171-7 (1957)
. Méthodes analytiques pour résines

(16) KROHNSTADT W.
Norsk Skognid 11, 186-8 (1957)
. Influence des variations du pourcentage de deux
isomères contenus dans un mélange sur le point de
fusion et la cristallisation.

(17) LECLERC H.
Précis de Phytothérapie (1922)
. Les toniques astringents
Cupressus sempervirens var. pyramidilis.

LECLERC H.
J. des Praticiens (1916)
. La phytothérapie tannique de la tuberculose
C. Sempervirens

LECLERC H.
Janus (1921)
. Le cyprés

(17) LECLERC H.
J. des Praticiens (1919)
. Le cyprés succédané indigène de l'hamamélis

Courrier médical (1919)
. La phytothérapie des troubles de la ménopause. Essai d'extraits de feuilles de cyprés.

J. des Praticiens (1919)
. Phytothérapie des hémorroïdes (cyprés)

Bull. de la Soc. de Thérap. (1920)
. Note sur l'emploi du C. Sempervirens dans le traitement des hémorroïdes

(18) MANGONI L.
(Univ. Rome)
Gazz. Chim. Ital. 96, (1-2), 209-19 (1966)
. Constituants de la résine du bois de C. Sempervirens

Tetrahedron letters 2643-9 (1964)
. Constituants de la fraction acide de la résine du bois de C. Sempervirens

(19) STORK G. et CLARKE F. H. Jr
Chandler Laboratory - Columbia University - New-York
J. of the Am. Chemical. Soc. 77,1, 1072 (1955)

(20) MEANIKOV F. A.
Acad. Wood. Technol. Leningrad. S.S.R.
Izv. Vyschikh. 134-6 (1963)
. Isomères de l'acide abiétique

(21) PLANCHON
Précis de Matière médicale (1928)
. Cyprés - Extraits de jeunes galbules

(22) RIFFER R.
Univ. California
Tappi 49 (9), 415-17 (1966)
. Composition d'une résine de conifère

(23) ROSSI P. F. et di MODICA G.
Atti della Accad. della Sc. di Torino
3, 96, 501 (1961-62)
. Substances extraites des parties dures du bois de cyprés

(24) SOKOLOV A. G.
Sb. Tr. Tsentr. Nank.
Inst. Lesokl. Prom. 98-105 (1961)
. Méthode de dosage de l'acide abiétique

(25) AKIRA TAHAO
Tokyo Inst. Phys.
Chem. Pharm. Bull. 328-31 (1963)
. Exemple d'influence d'un mélange d'isomères optiques sur le point de fusion

(26) ZAVARIN E. et ANDERSON A. B.
J. Org. Chem. 26, 1979-80 (1961)
. Recherche sur la fraction tropolonique des constituants du bois de Cupressus Pygmaea.

J. Org. Chem. 26, 173-76 (1961)
. Sur l'étude de la présence de l'α-Thujaplicinol dans le bois de C. Pygmaea.

--0--